

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Lucie Kulhavá

Stanovení pepsinogenů za použití IgY a IgG

Determination of pepsinogens using IgY and IgG

Diplomová práce

Školitel: Prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc.

Konzultant: Ing. Zdenka Kučerová, Csc.

Praha 2014

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru grantového projektu GA ČR P206/12/0381.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 23. května 2014

Lucie Kulhavá

Abstrakt

Snížení koncentrace pepsinogenu A v krevním séru je důležitým markerem rakoviny žaludku, stejně jako nižší poměr pepsinogenu A a pepsinogenu C.

V této práci byly porovnány vlastnosti imunoglobulinových frakcí izolovaných z vaječných žloutků po imunizaci slepic pepsinogem, který byl izolován z vepřové žaludeční sliznice, a králíčího séra získaného po imunizaci stejným antigenem.

Charakteristika a srovnání slepičích a králíčích protilátek bylo prováděno za použití metod: ELISA, afinitní chromatografie s imobilizovaným antigenem a hovězím sérovým albuminem, SDS a nativní elektroforézou a MALDI-TOF MS/MS.

Specifické králíčí protilátky měly značnou afinitu k antigenu a nízkou afinitu k hovězímu sérovému albuminu, a poskytovaly rozdíl mezi pre-imunní IgG a specifickou IgG, což u slepičích protilátek nebylo pozorováno. V případě slepičích protilátek nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi pre-imunní IgY a specifickou IgY proti vepřovému pepsinogenu, a dále byla zjištěna výrazná afinita k hovězímu sérovému albuminu u pre-imunní IgY i u specifické IgY proti vepřovému pepsinogenu.

Podobné výsledky byly získány i v experimentech, kdy byl použit lidský pepsinogen A a lidský pepsinogen C.

Klíčová slova: Pepsinogeny, ELISA, afinitní chromatografie, protilátky.

Abstract

A decreased concentration of pepsinogen A in serum was found to be a marker of gastric cancer, similarly as a low ratio of pepsinogen A to pepsinogen C.

In the present study we have compared properties of immunoglobulin fraction isolated from the egg yolks after immunization of laying hens with pepsinogen isolated from porcine gastric mucosa with those of present in rabbit antiserum obtained after the animal immunization with the same antigen.

The characteristics of chicken antibodies against porcine pepsinogen and the comparison with rabbit antibodies raised against the same antigen was carried out using the following methods: ELISA, affinity chromatography on immobilized antigen and bovine serum albumin, SDS and native electrophoresis and MALDI-TOF MS/MS.

While the rabbit specific antibodies interacted with the used antigen and only slightly with bovine serum albumin and there was a difference between pre-immune IgG and specific IgG, in the case of chicken antibodies IgY it did not work. No difference was observed between ELISA tests performed with pre-immune serum and the serum after immunization with porcine pepsinogen and a high interaction of IgY with bovine serum albumin in pre-immune serum and specific IgY after the immunization were detected.

Similar results were obtained in experiments with isolated human pepsinogen A and human pepsinogen C.

Key words: Pepsinogens, ELISA, affinity chromatography, antibodies.

Na tomto místě bych ráda poděkovala Prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc. a Ing. Zdence Kučerové, CSc. za cenné rady, trvalý zájem a připomínky k mé diplomové práci. Děkuji Prof. RNDr. Marii Tiché, CSc. za zájem o tuto práci, trpělivost a čas, který mi věnovala.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Michaele Rajčanové, RNDr. Janě Frýdlové, Ph.D., RNDr. Evě Miarkové, Ph.D. a Haně Muselové za předané zkušenosti, praktické rady a příjemné pracovní prostředí. Děkuji také RNDr. Petru Přikrylovi, Ph.D. za změření a vyhodnocení MALDI-TOF MS/MS analýzy.

Velký dík patří mým rodičům a všem členům mé rodiny, kteří mě při mých studiích podporovali a byli mi velkou oporou.

Obsah

Seznam zkratk	9
Úvod	10
1 Teoretický úvod	11
1.1 Aspartátové proteazy	11
1.1.1 Pepsiny a pepsinogeny.....	11
1.1.2 Vlastnosti pepsinů a pepsinogenů.....	12
1.1.3 Lokalizace lidských pepsinogenů.....	12
1.2 Patologické změny v lidské žaludeční sliznici	12
1.2.1 Peptický vřed.....	13
1.2.2 Gastritida.....	13
1.2.3 Rakovina žaludku.....	14
1.2.4 Změny hladin pepsinogenů při infekci bakterií <i>Helicobacter pylori</i>	14
1.3 Metody izolace veprového pepsinogenu ze žaludeční šťávy	14
1.3.1 Chromatografické metody.....	14
1.3.1.1 Iontově-výměnná chromatografie.....	15
1.3.1.1.1 Gelová chromatografie.....	15
1.3.1.1.2 Afinitní chromatografie.....	15
1.3.2 Elektromigrační metody.....	16
1.3.2.1 Zónová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu (SDS-PAGE).....	16
1.3.2.2 Nativní elektroforéza.....	16
1.4 Imunochemické metody	16
1.4.1 RIA.....	17
1.4.2 ELISA.....	17
1.5 Analytické metody	17
1.5.1 Stanovení koncentrace proteinů.....	17
1.5.2 Stanovení proteolytické aktivity enzymu.....	17
1.6 Slepíčí IgY a králíčí IgG	18
2. Cíl práce	20
3. Materiál a metody	21

3.1	Použitý materiál a chemikálie.....	21
3.2	Přístroje.....	22
3.3	Příprava slepičích a králíčích protilátek.....	23
3.4	Stanovení koncentrace proteinů – metody BCA.....	24
3.5	Stanovení proteolytické aktivity enzymu metodou Anson a Mirski.....	24
3.6	Elektroforéza.....	25
3.6.1	Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza.....	25
3.6.2	SDS elektroforéza.....	26
3.7	ELISA.....	27
3.8	Afinitní chromatografie IgY a IgG na Sepharose s imobilizovaným hovězím albuminem, nebo vepřovým pepsinogenem.....	29
3.8.1	Imobilizace hovězího albuminu, nebo vepřového pepsinogenu na CNBr- Sepharosu.....	29
3.8.2	Purifikace IgY a IgG na Sepharose s imobilizovaným hovězím albuminem, nebo vepřovým pepsinogenem.....	30
3.9	Dialýza.....	31
3.10	Isolace vepřového pepsinogenu na koloně DEAE-celuloze.....	31
3.11	Odsolení vepřového pepsinogenu pomocí gelové chromatografie – Sephadex G-100.....	32
4.	Výsledky.....	33
4.1	Isolace vepřového pepsinogenu z homogenátu vepřové sliznice.....	33
4.2	Porovnání kontrolní a specifické IgY a IgG proti vepřovému pepsinogenu.....	38
4.3	ELISA test - IgY a IgG a použití různých antigenů.....	40
4.4	IgY a IgG proti vepřovému PGA a různé blokační roztoky v ELISA testu.....	41
4.5	Afinitní purifikace IgY a IgG na sloupci Sepharosy s imobilizovaným hovězím sérovým albuminem.....	44
4.6	Afinitní purifikace IgY a IgG na sloupci Sepharosy s imobilizovaným vepřovým pepsinogenem.....	45
4.7	ELISA test IgY proti lidskému pepsinogenu A a pepsinogenu C.....	48
4.8	MALDI-TOF MS/MS analýza IgY a IgG.....	50
5.	Diskuse.....	52

6.	Závěr.....	54
7.	Seznam použité literatury.....	55

Seznam zkratek

BCA	bicinchoninic acid
BSA	bovina serum albumine
DEAE	diethylaminoethyl
ELISA	enzyme linked immuno-sorbent assay
H-PA	lidský pepsin A
H-PC	lidský pepsin C
H-PGA	lidský pepsinogen A
H-PGC	lidský pepsinogen C
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionization- time of flight
MS	mass spectrometry
OVA	ovalbumin
PAGE	polyacrylamide gel
PGA	pepsinogen A
PGC	pepsinogen C
pI	isoelectric point
RIA	radio immuno assay
rpm	rotations per minute
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine

Úvod

Lidská žaludeční sliznice obsahuje dvě hlavní skupiny aspartátových proteináz, pepsinogen A (PGA) a pepsinogen C (PGC), které se liší aminokyselinovým složením, a svými fyzikálně-chemickými i imunologickými vlastnostmi. Oba pepsinogeny jsou tvořeny několika izozymogeny, které se podařilo separovat a identifikovat pomocí nativní elektroforézy. K aktivaci pepsinogenů na příslušné pepsiny dochází v kyselém prostředí žaludku.

Již delší dobu jsou pozorovány souvislosti mezi hladinou lidských pepsinogenů a některými žaludečními onemocněními. Z diagnostického hlediska jsou zajímavé především poměry PGA/PGC (ale i poměry jejich izozymogenů) nejen v žaludeční sliznici, ale také v krevním séru. Pacienti s rakovinou žaludku a atrofickou gastritidou mají oproti zdravým jedincům významně snížený poměr pepsinogenu A k pepsinogenu C v krevním séru. Určení těchto změn by proto mohlo být významné pro včasnou diagnostiku zmíněných závažných onemocnění.

Předložená práce se zabývá charakterizací a izolací slepičích IgY a králičích IgG proti vepřovému pepsinogenu, který je izolovaný z vepřové žaludeční sliznice, a je použit jako modelová bílkovina k lidskému pepsinogenu A. Charakteristika připravených protilátek je prováděna ELISA testem. Porovnává připravené slepičí a králičí protilátky, která byly imunizovány stejným antigenem. Jedním z cílů je afinitní chromatografie s imobilizovaným hovězím sérovým albuminem a také antigenem, který byl použit na imunizaci. Dalším cílem je provedení ELISA testu slepičích protilátek proti lidskému pepsinogenu A a slepičích protilátek proti lidskému pepsinogenu C. Tato práce se zabývá vhodností slepičích protilátek pro diagnostické určení podílu pepsinogenu A a pepsinogenu C.

1. Teoretický úvod

1.1 Aspartátové proteázy

Aspartátové proteinázy patří do skupiny proteolytických enzymů, které katalyzují štěpení peptidových vazeb uvnitř polypeptidových řetězců [1]. V organismech jsou široce rozšířeny a plní řadu životně důležitých funkcí. Ve svém aktivním místě obsahují dva zbytky kyseliny asparagové, a proto se řadí do aspartátových proteáz. Stejně jako další aspartátové proteázy se vyznačují nízkým pH optimem proteolytické aktivity a jsou syntetizovány ve formě inaktivních proenzymů, které jsou také nazývány zymogeny [2].

1.1.1 Pepsiny a pepsinogeny

Pepsin A (E.C.3.4.23.1) je proteináza produkovaná ve formě zymogenu hlavními a mukózními buňkami v nejdůležitější části žaludku zvané corpus. Ze žaludeční sliznice se pepsinogen A (PGA) uvolňuje do žaludku a v malém množství také do krevního séra a moči. V kyselé žaludeční šťávě z něho vzniká aktivní forma – pepsin A, který štěpí peptidové vazby převážně mezi aromatickými aminokyselinami [3].

Pepsin C (E.C.3.4.23.3) je triviálním názvem gastriksin. Je produkován v inaktivní formě jako pepsinogen C (PGC) po celé žaludeční sliznici a na rozdíl od pepsinu A je produkován také v Brunnerových žlázách v proximálním duodenu a v pylorických žlázách v antru. Malé množství je sekretováno v epitelových buňkách prostaty a semenných váčcích, ze kterých se PGC dostává do semenného sekretu [4]. PGC se vyskytuje v krevním séru, ale na rozdíl od PGA není přítomen v moči.

U obratlovců byly nalezeny dva odlišné pepsiny – pepsin A (E.C.3.4.23.1) a pepsin C (E.C.3.4.23.3). Tyto pepsiny jsou produkovány ve formě příslušných inaktivních pepsinogenů buňkami žaludeční sliznice a jsou sekretovány do žaludeční dutiny, kde jsou přeměněny na aktivní enzym. Zastoupení jednotlivých pepsinogenů se liší v závislosti na živočišném druhu.

Například žaludeční sliznice prasete produkuje převážně PGA [5] a v malé míře i pepsinogen (PGB) [6,7]. Naproti tomu u potkana byl nalezen pouze PGC [8]. U primátů jsou syntetizovány PGA a PGC [9,10,11], přítomnost PGB zjištěna nebyla.

1.1.2 Vlastnosti pepsinů a pepsinogenů

Pepsinogeny jsou složeny asi z 370 aminokyselinových zbytků a jejich relativní molekulová hmotnost je asi 40 000 [1]. Jejich izoelektrický bod je ve srovnání s jinými proteiny nízký a jeho hodnota se pohybuje v rozmezí 3,7 - 3,95 [1,12]. Při aktivaci pepsinogenů na pepsiny dochází k odštěpení 40-50 aminokyselin [1,2], a tím ke snížení relativní molekulové hmotnosti zhruba na 35 000.

Pepsiny jsou proteolyticky aktivní při nízkém pH, nejvyšší aktivitu vykazují kolem pH 2-3. Se zvyšováním pH nad 3 jejich aktivita klesá. Při pH vyšším než 6,0 jsou pepsiny A i C neaktivní, ale jejich aktivitu lze obnovit snížením pH. Při pH vyšším než 7 jsou již oba pepsiny irreverzibilně denaturovány [13,14]. Pepsinogeny jsou na rozdíl od pepsinů stabilní v mírně kyselých až mírně alkalických pH. V pH nižších než 5 jsou pepsinogeny konvertovány na aktivní pepsiny. V pH vyšších než 8,5 jsou lidské PGA a PGC denaturovány [15]. Prasečí PGA je irreverzibilně denaturován až v pH vyšších než 10,5 [14].

1.1.3 Lokalizace lidských pepsinogenů

V roce 1981, 50 let po objevení pepsinu Schvannem, vytvořili Langley a Edkins základní model žaludeční sekrece pepsinu [16]. Model zahrnoval syntézu pepsinogenu, uchovávání v sekrečních granulích, secernování zymogenu z granulí a aktivaci. Oba pepsinogeny jsou sekretovány buňkami gastroduodenální sliznice současně.

Bylo prokázáno, že PGC je produkován také celou řadou lidských nádorových buněk, např. nádorovými buňkami pankreatu, ledvin nebo prsní žlázy [17].

1.2 Patologické změny v lidské žaludeční sliznici

Metabolismus PGA a PGC úzce souvisí s reabsorbí obou pepsinogenů z glomerulárního filtrátu. PGA je téměř reabsorbován a metabolizován ledvinami, zatímco PGC je metabolizován pouze ze dvou třetin [18]. Z tohoto důvodu je možné v krvi měřit koncentraci obou pepsinogenů, zatímco v moči se za fyziologických podmínek vyskytuje pouze PGA. Postupně jako ostatní bílkoviny i pepsinogeny mohou vstupovat do krve. Pepsinogeny sekretované v žaludku a duodenu mohou být reabsorbovány intestinální sliznicí [19]. Hladina pepsinogenů v krevním séru přímo souvisí s jejich produkcí v žaludku. Z jejich koncentrace v séru je možno usoudit o mimořádnosti ve struktuře a funkci žaludeční sliznice [20].

U zdravých jedinců je koncentrace PGA v séru vždy vyšší než PGC. Normální poměr PGA/PGC je přibližně 3:1 [21]. Koncentrace lidských pepsinogenů v séru u zdravých jedinců se pohybují od 20 do 175 µg/l, u PGC o 1,1 do 18 µg/l [22,23,24].

Vztah mezi hladinami pepsinogenů a různými patologickými stavy se zkoumá řadu let. Nejvíce je věnováno měření koncentrace PGA a PGC v krevním séru pacientů s různými onemocněními žaludku.

Již mnoho let je studována souvislost mezi změnou exprese a produkce pepsinogenů a různými patofyziologickými stavy organismu. Například u pacientů s rakovinou prsu [25,26,27], karcinomem ovarií [28] nebo karcinomem prostaty [29,30] byla prokázána produkce PGC v zasažených tkáních či v jejich částech, kde není za normálního fyziologického stavu tento pepsinogen produkován.

1.2.1 Peptický vřed

Peptický vřed je ohraničený slizniční defekt pronikající vrstvou žaludeční sliznice. Podle lokalizace se dělí na duodenální a žaludeční. Peptické vředy patří mezi onemocnění způsobenou kombinací genetických faktorů, vlivu životního stylu a prostředí. Hodnoty PGA a PGC jsou u obou vředových chorob zvýšené. Poměr PGA/PGC je značně zvýšený u pacientů s duodenálním vředem, a proto je rizikový faktor tohoto onemocnění [4].

1.2.2 Gastritida

Rozlišují se dva základní typy gastritidy – akutní a chronická. Akutní gastritida je onemocnění, které trvá několik dnů. Nejčastější příčinou je virová nebo bakteriální infekce.

Při akutní gastritidě dochází k vzestupu sérových hladin PGA i PGC.

Chronickou gastritidu lze definovat jako přítomnost chronických zánětlivých změn sliznice, které mohou vést k atrofii a metaplazii sliznice. Chronickou gastritidu lze rozlišit na povrchovou, mírnou až středně a atrofickou. Povrchová gastritida je spojena s vzrůstem sérových hladin PGA i PGC. U pacientů s mírnou až střední gastritidou je typický pokles hladiny sérového PGA a trvalé zvýšení hladiny PGC. Poměr PGA/PGC je u těchto pacientů nižší než u zdravých jedinců a pacientů s povrchovou gastritidou. Hodnoty PGA jsou sníženy z důvodu zánětlivých procesů, při kterých dochází ke ztrátě

hlavních buněk [31]. Pacienti s těžkou atrofickou gastritidou mají hladinu sérového PGA značně nižší, ale hladina PGC se od normálu příliš neliší.

1.2.3 Rakovina žaludku

Během posledních let se značně zvýšil počet případů úmrtí, které souvisejí s nádorovými onemocněními zažívacího traktu. Huang a spol. [24] zjistili, že hladina PGC v séru pacientů s rakovinou žaludku příliš neliší oproti kontrole. Hodnota sérového PGA je však značně nižší a to jak v počáteční fázi onemocnění tak i v pozdní formě.

Stanovení sérových pepsinogenů má velký diagnostický význam k zjištění časné formy rakoviny žaludku [23]. PGA je považován za specifický marker karcinomu žaludku a dalších žaludečních onemocnění [32]. Hodnota sérového PGA byla studována u pacientů s rakovinou žaludku různých věkových skupin a pohlaví [33]. Bylo zjištěno, že ve vyšším věku (nad 55 let) je hladina PGA u mužů i žen přibližně stejná. Znatelné rozdíly jsou diagnostikovány ve věkové skupině do 32 let.

1.2.4 Změny hladin pepsinogenů při infekci bakterií *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori je spirální bakterie s bičíkem, která má roli ve vzniku některých žaludečních onemocnění, gastritidy, peptického vředu, některých nádorů žaludku [34]. *Helicobacter pylori* pozitivní jedinci mají na rozdíl od *Helicobacter pylori* negativních významně vyšší hladiny PGA i PGC a nižší poměr PGA/PGC [35,36,37]. Po eradikaci (vymýcení) *Helicobacter pylori* dochází k významnému snížení hladin PGA a PGC a k významnému vzrůstu poměru PGA/PGC [36,38].

1.3 Metody izolace vepřového pepsinogenu ze žaludeční šťávy

1.3.1 Chromatografické metody

Dosud neexistuje jednoduchá univerzální metoda izolaci, purifikaci a separaci pepsinů a jejich zymogenů. Většina publikovaných postupů pro tyto proteiny zahrnuje kombinace chromatografických metod.

1.3.1.1 Iontově-výměnná chromatografie

Iontově-výměnná chromatografie je jednou z nejpoužívanějších metod separace proteinů, která využívá jejich rozdílných nábojů. Náboj proteinu je silně závislý na pH, při pH vyšším než pI jsou proteiny zachyceny na anexy a při pH nižším než pI jsou proteiny adsorbovány na katexy. Zachycené proteiny jsou eluovány změnou pH nebo zvýšením iontové síly.

K purifikaci a frakcionaci pepsinogenů z extraktu lidské žaludeční sliznice se nejčastěji používá anex DEAE-celulosa [39,40]. Na tomto sorbentu byly separovány pepsinogeny z homogenátů lidské žaludeční sliznice. Opakovaným dělením lze získat PGA a PGC. Separace pepsinogenů založená na opakovaném dělení na DEAE-celulose je však časově náročná, trvá i několik dní. Nevýhodou je i velká spotřeba biologického materiálu.

1.3.1.2 Gelová chromatografie

Gelová chromatografie je metoda umožňující dělení látek na základě rozdílu ve velikosti a tvaru jejich molekul. Principy gelové chromatografie jsou využívány k dělení látek podle relativní hmotností nebo velikostí molekul bez závislosti na iontové síle a pH roztoku a teplotě. A dále také k odsolování, a to k oddělení velkých a malých molekul a také k zahušťování vzorku, které je prováděno přidáním suchého nosiče k roztoku vzorku, který bobtná, čímž váže vodu ze vzorku.

1.3.1.3 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je metoda založena na tvorbě specifických komplexů. Na povrchu pevného nosiče je kovalentní vazbou vázána selektivní látka (ligand) pro danou bílkovinu.

V afinitní chromatografii se nejčastěji využívá komplexů: antigen- protilátka, enzym- substrát, enzym- kofaktor atd. Imobilizací jedné z těchto složek se připraví biospecifický adsorbent, který ze směsi zachytí žádanou látku a vytvoří s ní nerozpustný komplex. Po vymytí balastních látek směsí, izolovaná látka se z komplexu uvolní změnou složení elučního roztoku.

1.3.2 Elektromigrační metody

Elektromigrační metody jsou založeny na elektroforetickém pohybu ionizovaných částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohyblivost iontů závisí na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekul, na povaze nosiče, elektrolytu atd. V případě amfoterních iontů, bílkoviny a peptidy, závisí velikost náboje na pH.

1.3.2.1 Zónová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu (SDS-PAGE)

SDS-PAGE je často využívaná metoda pro stanovení molekulových hmotností bílkovin a dvourozměrná elektroforéza k stanovení peptidových map bílkovin. Základem je elektrofóza komplexů denaturovaných bílkovin (peptidů v případě peptidových map) s anionickým detergentem dodecyl sulfátem sodným (SDS). Nábojové rozdíly mezi různými peptidy se navázáním SDS téměř potlačí, komplexy protein-SDS jsou v neutrálním, v alkalickém prostředí silně negativně nabitě a putují k anodě. Komplex prochází polyakrylamidovým gelem o vhodné porezitosti, a jeho pohyblivost je dána velikostí molekuly. Separované fragmenty jsou nejčastěji detekovány specifickým barvením, fluorescenčním nebo radioaktivním značením.

V současné době je tato technika používána pro přípravu vzorků pro mikrosekvenci či charakterizaci pomocí hmotové spektrometrie [41].

1.3.2.2 Nativní elektroforéza

Proteiny jsou při nativní elektroforéze separovány na základě svého náboje, velikosti a tvaru. Probíhá bez denaturačních činidel. Citlivost elektroforézy je dána charakterem póru gelu.

1.4 Imunochemické metody

Nejvýznamnější imunochemické metody jsou RIA (radioimmunoassay) a ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Imunochemické metody jsou vysoce citlivé, a na rozdíl od metod stanovujících množství enzymu na základě jeho aktivity, mohou se stanovit i inaktivní enzymy.

1.4.1 RIA

RIA je metoda založena na úspěšnosti soutěži obsazování místa radioaktivně značeným antigenem a antigenem ze vzorku při vazbě na specifickou protilátku. Značeného antigenu se přidává vždy stejné množství. O tom, kolik se kterého antigenu naváže, rozhoduje pouze koncentrace stanovovaného antigenu ve vzorku. Po oddělení komplexu protilátky s oběma navázanými formami antigenu z reakční směsi se změní radioaktivita, jejíž množství je nepřímo úměrné koncentraci antigenu v neznámém vzorku [42]. Samloff použil ke značení pepsinogenů radionuklid I^{125} [43].

1.4.2 ELISA

Metoda založena na stejném principu jako je metoda RIA, ale s tím rozdílem, že místo značení radionuklidem se používá enzymová reakce. Bylo popsáno více variant ELISA [42]. Metoda ELISA byla použita ke stanovení pepsinogenů v séru i v extraktu ze žaludeční sliznice. Například Huang a spol. [24] nejprve navázali na povrch polystyrenových jamek desky antigen, extrakt ze žaludeční sliznice, a po vyvázání volných míst inkubovali s monoklonální protilátkou proti PGC (popř. PGA). Dále pak použili inkubaci se sekundární protilátkou značenou alkalickou fosfatase. Jako substrát byl použit p-nitrofenylfosfát.

Citlivost RIA a ELISA je téměř srovnatelná. Obě techniky byly porovnávány např. při stanovení PGC v séru [24].

1.5 Analytické metody

1.5.1 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena BCA (bicinchoninic acid) metodou [44]. Toto stanovení je založeno reakci peptidové vazby s Cu^{2+} ionty v alkalickém prostředí za vzniku Cu^+ iontů, které následně tvoří s BCA purpurově zbarvené komplexy. Pro sestrojené kalibrační přímky byly použity roztoky hovězího sérového albuminu o známé koncentraci 2 mg/ml.

1.5.2 Stanovení proteolytické aktivity enzymu

Proteolytická aktivita enzymu byla stanovena modifikovanou metodou dle Ansona a Mirského [45]. Tato metoda je založena na štěpení hovězího hemoglobinu

enzymem za vzniku peptidů, jejichž množství je přímo úměrné aktivitě enzymu a stanovuje se BCA metodou (viz. 1.5.1) pro vysrážení nerozštěpeného hemoglobinu a enzymu trichloroctovou kyselinou (TCA). Proteolytická aktivita je vyjadřována v jednotkách PU.

1 PU je takové množství enzymu, které přemění za 1 min při pH 2 a 37 °C takového množství hemoglobinu na peptidy, že uvolněné peptidy způsobí změnu absorbance ΔA_{540} o 0,001 měřeno BCA metodou.

1.6 Slepíčí IgY a králičí IgG

Humorální imunitní reakce je charakteristická tvorbou sérových imunoglobulinů, nazývaných protilátky, které jsou produkovány B-lymfocyty jako odpověď organismu na průnik cizorodé látky (antigenu) do vnitřního prostředí. Protilátky lze využívat jak pro navození či zvýšení imunity v humánní i veterinární medicíně (vakcinace). Protilátky jsou pak nejčastěji izolovány z krve experimentálního zvířete (například potkana, králíka, ovce, prasete, koně apod.), která je získána buď několika odběry během života, nebo srdeční punkcí vedoucí ke smrti zvířete.

Takto získané protilátky jsou polyklonální, neboť jsou produkovány mnoha různými klony B-lymfocytů. Jelikož reagují s mnoha antigenními epitopy, označují se tyto protilátky jako polyspecifické. Reaguje-li protilátka jen s jedním antigenním epitopem, je monospecifická. Monospecifická protilátka však může být mono- i polyklonální.

Protilátky jsou tvořeny dvěma těžkými (H) a dvěma lehkými (L) řetězci, které jsou vzájemně kovalentně propojeny cystinovými můstky. Těžký řetězec (50 000- 75 000) obsahuje tři nebo čtyři konstantní domény a jednu variabilní doménu. Lehký řetězec (20 000- 25 000) se skládá z jedné konstantní domény a jedné domény variabilní. Domény, tvořené sekvencí asi 110–120 aminokyselin, jsou propojeny krátkými spojovacími úseky polypeptidového řetězce.

Dle typu těžkého řetězce (μ , δ , γ , α , ϵ) dělíme imunoglobuliny do pěti tříd (IgM, IgD, IgG, IgA a IgE). Každý z pěti typů H řetězce se může kombinovat s jedním ze dvou typů L řetězce (κ , λ). Majoritní zastoupení v krvi savců má IgG. V krvi ptáků (ale i plazů a obojživelníků) a ve vaječném žloutku se nachází IgY (z angl. yolk – žloutek). Ptačí protilátky IgY jsou funkčně analogické savčím IgG.

Pokud provedeme srovnání např. králíka se slepicí z pohledu produkce protilátek, docházíme k velmi pozoruhodnému závěru, že jedna slepice za rok vyprodukuje přibližně 30x více IgY, než kolik IgG lze získat z krve králíka za stejné období [46]. Koncentrace protilátek ve žloutku je dokonce 1,3–1,9 x vyšší než v krvi slepice [47,48].

Porovnání slepice a králíka vzhledem k dosaženým titrům specifických protilátek (v ELISA) nevede k jednoznačným závěrům hovořícím ve prospěch jednoho nebo druhého experimentálního systému. I při dodržení srovnatelného postupu imunizace obou druhů zvířat, titry protilátek závisí především na imunogenicitě daného antigenu pro příslušný druh. Například pro jeden serotyp lidského rotaviru jsou slepice schopny vytvořit protilátky, které mají neutralizační titr téměř 4x vyšší než srovnatelné protilátky králíčí, naopak v případě dalšího serotypu jsou přibližně 2x horší [46]. Další výhoda slepičího systému spočívá v tom, že i při velmi nízkých dávkách savčích antigenů (0,001-0,01 mg/dávku), slepice produkují protilátky s vysokými titry [49].

Jednou ze zásadních překážek širšího použití slepic k produkci protilátek je pravděpodobně izolace IgY ze žloutku. IgY, které tvoří přibližně 5% z celkového obsahu proteinů žloutku, jsou spolu s ostatními glykoproteiny a převážně lipoproteiny součástí komplexní emulze žloutkových lipidů [50]. Prvním krokem izolace, po separaci žloutku, je vždy oddělení lipidní frakce precipitačními činidly, extrakce organickými rozpouštědly, vymrazení nebo hydrofobní chromatografie. Frakce ve vodě rozpustných proteinů je v dalších krocích izolace dělena frakčním srážením nebo chromatografií na ionexech či gelových sítích [51-57]. K získání monospecifických IgY se lze použít techniku afinitní chromatografie na imobilizovaném antigenu. Specificky sorbovaný IgY je eluován silně kyselým nebo bazickým pufrům [58,59]. Purifikované IgY jsou velmi stabilní, při skladování při 4 °C po dobu 10 let nezměnily své aktivity [60].

Protilátky jsou izolovány z vajec nikoliv z krve, je tak zásadním způsobem omezen stres zvířete jen na nezbytnou míru injekční aplikace antigenu. Nemá třeba utrácet pokusná zvířata k získání větších objemů krve pro izolaci potřebného množství séra. Za období snášky je jedna slepice schopna vyprodukovat tolik protilátek jako několik desítek králíků.

2. Cíl práce

Isolovat vepřový pepsinogen z homogenátu žaludeční sliznice, a jeho použití jako modelové bílkoviny pro lidské pepsinogen A.

Charakterizovat slepičí IgY a králičí IgG proti vepřovým pepsinogen testem ELISA. Porovnání kontrolní (pre-imunní) a specifické protilátky IgY a IgG proti vepřovému pepsinogenu. Vyhodnocení interakce s jinými antigeny, kterými nebylo imunizováno. Optimalizace blokačního kroku v testu ELISA u použití slepičích IgY a králičích IgG proti vepřovému pepsinogenu.

Na základě výsledků provést afinitní chromatografii na CNBr-sacharose s imobilizovaným hovězím albuminem a také vepřovým pepsinogenem.

Provést identifikaci slepičích IgY a IgG na MALDI-TOF MS/MS.

Provést ELISA test slepičích IgY proti lidskému pepsinogenu A a slepičích IgY proti lidskému pepsinogenu C, a to za použití pepsinogenu A a pepsinogenu C izolovaných z lidské žaludeční šťávy jako antigenů.

3. Materiál a metody

3.1 Použitý materiál a chemikálie

- BCA Protein Assay reagent – Pierce (USA)
- síran měďnatý p.a. – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
- roztok hovězího sérového albuminu o koncentraci 2 mg/mL (standard pro stanovení proteinů) - Pierce (Rockford, IL, USA)
- kyselina chlorovodíková – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
- hovězí hemoglobin - Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- kyselina trichloroctová – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
- akrylamid – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- N,N'-methylenbisakrylamid – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- tris-(hydroxymethyl)-aminomethan čistý – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
- persíran amonný – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin) – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- barbital sodný – Kulich, Hradec Králové (ČR)
- sacharóza – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
- kyselina fosforečná – Penta, Chrudim (ČR)
- modř bromfenolová – Lachema, Brno (ČR)
- Coomassie brilliant blue R-250 – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- glycin – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
- SDS – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- glycerol – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
- merkaptoethanol – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- hovězí pepsinogen – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- lidský pepsinogen A – Cell Sciences®, Canton (USA)
- lidský pepsinogen C – Cell Sciences®, Canton (USA)
- vepřový pepsinogen – poskytnuto Ústavem patologické fyziologie 1. lékařské fakulty UK Praha (ČR)
- lidský pepsinogen A – poskytnuto Ústavem patologické fyziologie 1. lékařské fakulty UK Praha (ČR)

- lidský pepsinogen C - poskytnuto Ústavem patologické fyziologie 1. lékařské fakulty UK Praha (ČR)
- hovězí sérový albumin – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- kuřecí ovalbumin – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- pepsin A – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- primární kontrolní (před imunizací) slepičí protilátka proti vepřovému pepsinogenu – Hena, s.r.o. (Praha, ČR)
- primární specifická (po imunizaci) slepičí protilátka proti vepřovému pepsinogenu – Hena, s.r.o. (Praha, ČR)
- primární kontrolní (před imunizací) králičí protilátka proti vepřovému pepsinogenu (krevní sérum) – Hena, s.r.o. (Praha, ČR)
- primární kontrolní (po imunizaci) králičí protilátka proti vepřovému pepsinogenu (krevní sérum) – Hena, s.r.o. (Praha, ČR)
- sekundární králičí protilátka proti slepičí protilátce značená alkalickou fosfatázou – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- sekundární kozí protilátka proti králičí protilátce značená alkalickou fosfatázou – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- želatina z rybích kůží – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- chlorid sodný – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
- hydrogenfosforečnan sodný – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
- Tween® - Amresco, Solon (USA)
- uhličitan sodný – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
- chlorid hořečnatý – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
- hydroxid sodný – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
- p-nitrofenylfosfát – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- CNBr- aktivovaná Sepharosa 4B – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- diethylamin – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- citronan sodný – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
- kyselina citronová – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
- DEAE-celuloza (diethylaminoethyl celuloza)– Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- Sephadex® G-100 – Pharmacia, Fine Chemicals (Uppsala, Švédsko)

- Na přípravu všech roztoků k jednotlivým metodám použitých v diplomové práci byla použita destilovaná voda. Připravena přístrojem Milli-Q systém pro přípravu destilované vody (Millipore, Billerica, MA, USA).

3.2 Přístroje

- Spektrofotometr: Mutliscan Micro plate Reader MCC/340 (Thermo FisherScientific, Waltham, MA, USA)
- Spetrofotometr: Spektroforometr (Eppendorf, Hamburk, SRN)
- AccuBlock Digital Dry Bath (Labnet International, Oakham, Rutland, UK)
- Centrifuga Eppendorf s chlazením 5415R (Eppendorf, Hamburk, SRN)
- Aparatura na elektroforézy: Mini-PROTEAN III (BioRad, Praha, ČR)
- Zdroj pro elektroforézu: Power PAC 3000 (BioRad, Praha, ČR)
- Milli-Q systém pro přípravu destilované vody (Millipore, Billerica, MA, USA)
- Analytické váhy: XT 120A (Precisa, Švýcarsko), BL150 (Sartorius, Německo)
- Digitální pH-metr Jenway (Essex, UK)

3.3 Příprava slepičích a králičích protilátek

Imunoglobulinová frakce z vaječného žloutku od slepice imunizované vepřovým pepsinogenem, který byl izolován z vepřového žaludku, byla připravena firmou Hena, s.r.o. (Praha, ČR). Slepice byly imunizovány celkem třikrát, vždy 0,1 mg proteinu (vepřového pepsinogenu) v 0,5 ml fyziologického roztoku (0,9% vodný roztok chloridu sodného) v intervalu přibližně 7 dní. Pro 1. dávku byl použit kompletní Freundovo adjuvans a u dalších dvou dávek bylo použito nekompletní Freundovo adjuvans. Podání bylo intramuskulární (1. dávka) a subkutánní (2. a 3. dávka).

Adjuvans je látka podporující imunitní odpověď. Jsou to anorganické nebo organické látky, nebo celé buňky některých usmrcených bakterií, které zesilují imunitní reakci na podaný antigen. Používá se jako nezbytná složka vakcín nebo při produkci protilátek z imunizovaných zvířat. Freundovo adjuvans je nejčastěji používané adjuvans při pokusech na zvířatech. Kompletní Freundovo adjuvans představuje suspenzi usmrcených mykobakterií v emulzi oleje s vodou.

Vejce slepic byla sbírána i před imunizací, tím byla získána imunoglobulinová frakce z vaječného žloutku od slepic, tedy kontrolní protilátka. Imunoglobulinová frakce z vaječného žloutku od slepice po imunizaci je specifická protilátka, v tomto případě specifická slepičí protilátka proti vepřovému pepsinogenu.

3.4 Stanovení koncentrace proteinů – metody BCA

Roztoky:

BCA Protein Assay reagent – roztok A

5% roztok síranu měďnatého – roztok B

roztok hovězího sérového albuminu o koncentraci 2 mg/ml

mikrotitrační destička

Postup:

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 20 μ l vzorku nebo standardu o známé koncentraci a k tomu bylo přidáno 200 μ l reakčního roztoku A + B, který je smíchán v poměru 49:1. Mikrotitrační destička byla 3 minuty třepána, a pak inkubována 30 min při 60 °C. Absorbance byla změřena při vlnové délce 540 nm. Stanovení bylo prováděno v duplikátech. K sestavení kalibrační přímky byly použity roztoky hovězí sérového albuminu o známé koncentraci.

3.5 Stanovení proteolytické aktivity enzymu metodou Anson a Mirski

Roztoky:

2,5% roztok hemoglobinu (0,25 g v 10 ml vody)

0,3 mol/l kyselina trichloroctová

Postup:

Do plastových zkumavek s víčkem bylo pipetováno 250 μ l roztoku hemoglobinu, který byl temperován 10 min při teplotě 37 °C. Následně pak bylo přidáno 50 μ l vzorku. Reakce byla přesně po 10 minutách ukončena přidáním 500 μ l 0,3 mol/l kyseliny trichloroctové. Po dalších 5 minutách byly zkumavky vyndány z lázně. Roztoky ve zkumavkách byly odstředovány v centrifuze po dobu 15 minut při 12 000 rpm a 8 °C.

V supernatantu byla stanovena koncentrace peptidů metodou BCA (viz. kap. 3.4).

3.6 Elektroforéza

3.6.1 Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza

Roztoky:

Roztok P = akrylamidová směs, 30 g akrylamidu + 0,8 g methylenbisakrylamidu

doplněno do 100 ml vody

Roztok R = akrylamidová směs, 10,5 g akrylamidu a 2,6 g methylenbisakrylamidu

doplněno do 100 ml vody

Roztok S = 8,5 g tris-(hydroxymethyl)-aminomethan s HCl pH 7,5 do 100 ml vody (při přípravě gelů nutno 10x ředit)

Roztok Z = 2,4 g tris-(hydroxymethyl)-aminomethan s H_3PO_4 pH 5,5 do 100 ml vody (při přípravě gelů nutno 10x ředit)

Roztok X = 2 ml roztok P + 3 ml roztok S + 0,9 ml vody

Roztok Y = 1 ml roztok R + 1,5 ml Z + 0,45 ml vody

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin)

10% roztok persíranu amonného

Separční gel:

7 ml roztoku X + 2,4 μl TEMED + 70 μl 10% roztok persíranu amonného

Zaostřovací gel:

3 ml roztok Y + 2,5 μl TEMED + 50 μl 10% roztok persíranu amonného

Elektrodový pufr:

2g tris-(hydroxymethyl)-aminomethan + 12,5 g barbitátu sodného rozpuštěno

v 1 l vody, upraveno pH 7,5 a doplněno do 2 l vody

Vzorkový pufr:

40% sacharosa v 30 mmol/l tris-(hydroxymethyl)-aminomethan s H_3PO_4 pH 5,5 +

0,1% bromfenolovou modř

Postup:

K separaci byla použita vertikální chlazená elektroforéza Mini Protean® 3 cell (Bio-Rad) o rozměrech skel $10 \times 8,2$ cm a tloušťce gelu 1 mm. Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 2:1 a naneseny do jamek zaostřovacího gelu (25 μl vzorku/jamku).

Preelektroforéza trvala přibližně 30 min při konstantním napětí 150V, když vzorky v gelu prostoupily k separačnímu gelu, bylo napětí přenastaveno na 400 V a bylo prováděno chlazení při 7 °C.

Po skončení elektroforetické separace byl polyakrylamidový gel inkubován v roztoku 60 mmol/l HCl obsahující 0,6% hemoglobin 0,5 h, stabilizován v roztoku 10% sulfosalicylové kyseliny (30 min), obarven v Coomassie Brilliant Blue R-250.

Bílkoviny se jevíly jako bílé pruhy na modrém pozadí.

3.6.2 SDS elektroforéza

Roztoky:

12% separační gel:

2,5 ml akrylamidové směsi (30% akrylamid (15g) + 8% methylenbisakrylamidu (0,4 g) v 50 ml destilované vody

3,6 ml 0,375 mol/l tris-(hydroxymethyl)-aminomethan /HCl pH 8,8

5 µl TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin)

60 µl 10% persíranu sodného

5% zaostřovací gel:

1,5 ml destilované vody

0,33 ml akrylamidové směsi (30% akrylamid (15g) + 8% methylenbisakrylamidu (0,4 g) v 50 ml destilované vody

0,25 ml 1 mol/l Tris/HCl pH 6,8

20 µl 10% SDS

2 µl TEMED

20 µl 10% persíranu sodného

elektroforetický pufr (pH 8,3):

6,06 g tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

28,82 g glycin

10 ml 10% SDS

2 l destilované vody

vzorkový pufr (pH 6,8):

0,126 mol/l tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

4% SDS

20% glycerol
10% merkaptoethanol
bromfenolová modř

Postup:

Elektroforéza byla provedena v aparatuře Mini-PROTEAN (BioRad). Mezi skla sestavené aparatury byl nalit 12% separační gel do přibližně 2/3 výšky skla. Separační gel byl převrstven propanolem. Po zpolymerování separačního gelu byl propanol vysušen z prostoru mezi skly filtračním papírem. Na separační gel byl navrstven 5% roztok zaostřovacího gelu, do kterého byl vnořen hřeben na vzorkové komůrky.

Vzorky byly před nanesením na gel smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 1:1 a denaturovány varem 5 minut v termobloku na 95 °C, a ponechány zchladnout na laboratorní teplotu. Takto připravené vzorky (40 µl) a standard (5 µl) byly naneseny do komůrek v zaostřovacím gelu.

Separace proteinů probíhala při konstantním napětí 150 V přibližně 90 min. Po ukončení byla provedena barvení Coomassie Brilliant Blue R-250 pro detekci proteinů.

3.7 ELISA

Roztoky a laboratorní pomůcky:

Antigeny: vepřový pepsinogen A (vepř. PGA), hovězí sérový albumin (BSA), slepičí ovalbumin (OVA), pepsin A prasečí

Primární protilátka: kontrolní a specifická protilátka

Sekundární protilátka značená alkalickou fosfátasou

2 % roztok balastní bílkoviny (ovalbumin, lyzát z rybích kůží, řídký bílek)

promývací pufr: fosfátový pufr s 0,05% Tween® pH 7,5

fosfátový pufr pH 7,5 – ředění primární a sekundární protilátky

uhličitanový pufr pH 9,6 (5,6 mmol/l Na₂CO₃, 35 mmol/l NaHCO₃)

0,2 mol/l hydrogenuhličitan sodný

0,2 mol/l uhličitan sodný

1 mol/l chlorid hořečnatý

p- nitrofenylfosfát

3 mol/l NaOH

destička MultiSORP

Postup:

Byly připraveny roztoky antigenů o koncentraci $\sim 4 \mu\text{g/ml}$ v uhličitanovém pufru pH 9,6, pipetou do jamek destičky bylo pipetováno 100 μl tohoto roztoku. Deska byla zakryta víčkem a při 5 °C ponechána přes noc v lednici.

Roztok druhý den byl švihem odstraněn a komůrky promyty 5 dávkami PBS-Tween® pH 7,5 ($\sim 200 \mu\text{l}$ na jamku). K osušení povrchu desky mezi jednotlivými kroky byl použit filtrační papír nebo buničina.

Do promytých jamek desky bylo pipetováno 150 μl blokovacího roztoku obsahujícího 2% balastní bílkovinu. Deska byla zakryta víčkem, a ponechána 1 hodinu při 37 °C blokovat.

Dále byla připravena koncentrační řada, kontrolní a specifické protilátky naředěné v pufru PBS pH 7,5.

Z komůrek byl odstraněn blokovací roztok, a bylo aplikováno 100 μl roztoku naředěné primární protilátky. Deska byla zakryta víčkem, a inkubována 2 hodiny při 37 °C.

V dalším kroku byla odstraněna primární protilátka, destička byla promyta 5 dávkami PBS Tween® pH 7,5 ($\sim 200 \mu\text{l}$ na jamku).

Sekundární protilátka značená alkalickou fosfátasovou byla ředěna pufrem PBS pH 7,5. Do každé jamky bylo aplikováno po 100 μl roztoku a následně inkubováno 1 hodinu při 37 °C.

Po odstranění sekundární protilátky byla deska promyta 5 dávkami PBS Tween® pH 7,5 ($\sim 200 \mu\text{l}$ na jamku). Pak bylo na do jamek pipetováno 200 μl PBS Tween® pH 7,5 a ponecháno 15 minut při laboratorní teplotě. Následně pak promyto 5 dávkami téhož roztoku.

Pro vyvolání desky byl připraven roztok substrátu, p-nitrofenylfosfát (15mg) byl rozpuštěn v roztoku o složení 2,1 ml 0,2 mol/l NaHCO_3 , 1,5 ml 0,2 mol/l Na_2CO_3 , 15 μl 1 mol/l MgCl_2 + substrát (15mg) a doplněn do 11,4 ml destilovanou vodou. Do každé jamky bylo aplikováno maximální rychlostí po 100 μl roztoku. Po 10 minutách bylo vyhodnocováno zabarvení v jamkách čtečkou (ELISA Reader) při vlnové délce 405nm. Přístroj byl nulován na vzorek v jamce, kde nebyla obsažena primární protilátka a obsahovala příslušný antigen a sekundární protilátku.

Po nedostatečném vybarvení roztoku v jamkách bylo měření opakováno po dalších 10 minutách, nebo dle potřeby. Vybarvovací reakci je možné zastavit 100 μ l 3 mol/l NaOH na jamku.

3.8 Afinitní chromatografie IgY a IgG na Sepharose s imobilizovaným hovězím albuminem, nebo vepřovým pepsinogenem

3.8.1 Imobilizace hovězího albuminu, nebo vepřového pepsinogenu na CNBr-Sepharosu

Roztoky:

CNBr- Sepharosa 4B

Ligandy : BSA (hovězí albumin), PGA (vepřový pepsinogen A)

Vazebný pufr: 0,1 mol/l NaHCO₃ pH 8,3 (obsahující 0,5 mol/l NaCl)

1 mmol/l HCl

0,2 mol/l roztok glycinu pH 8,0

0,15 mol/l NaCl

1 mol/l NaCl

Postup:

CNBr-aktivovaná Sepharosa 4B (2 g) byla rozmíchána v 1 mmol/l HCl (75 ml) a byla ponechána přes noc (15 hodin) bobtnat při 25°C. Poté byl gel přenesen na fritu a promyt 1 mmol/l HCl (50 ml). Roztok BSA ve vazebném pufru o pH 8,3 (60 mg v 7 ml) byl smíchán s CNBr-Sepharosou promytou vazebným pufrům o pH 8,3 (15 ml).

Suspense byla třepána přes noc při 4°C. Poté byl gel na fritě promyt vazebným pufrům (15 ml). Pro zablokování neobsazených aktivních skupin byl ke gelu přidán 0,2 mol/l roztok glycinu o pH 8,0 (2 ml). Suspenze byla při laboratorní teplotě mírně třepána po dobu 2 hod., a poté na fritě postupně promyta 50 ml vodou, 50 ml 0,15 mol/l NaCl,

50 ml 1 mol/l NaCl a 50 ml 0,15 mol/l NaCl. Bylo přibližně určeno množství navázaného BSA: 19 mg na 5 ml gelu.

V případě imobilizace vepřového pepsinogenu na CNBr-Sepharosu byl postup totožný jako u imobilizace hovězího albuminu. Na CNBr- aktivovanou Sepharosu (3,5 ml nabobtnalého gelu) byl imobilizován vepřový pepsinogen (20 mg). Bylo přibližně určeno množství navázaného vepřového pepsinogenu: 15 mg na 3,5 ml gelu.

3.8.2 Purifikace IgY a IgG na Sepharose s imobilizovaným hovězím albumine, nebo vepřovým pepsinogem

Roztoky:

Specifická slepičí a králičí protilátka

0,05 mol/l Tris/HCl pufr, pH 7,4 (obsahující 0,15 mol/l NaCl)

0,05 mol/l diethylamin (pH 11,5)

1 mmol/l HCl

1 mol/l citrátový pufr, pH 6,5

Postup:

Izolované slepičí a králičí protilátky připravené prof. Hodkem, byly zředěny pomocí pufru 0,05 mol/l Tris/HCl obsahující 0,15 mol/l NaCl o pH 7,4. Sepharosa s imobilizovaným BSA (PGA) byla přenesena do dvou mikrozkušavek a smíchána s roztokem slepičích (králičích) protilátek. Mikrozkušavky byly ponechány při 4°C inkubovat přes noc za mírného míchání.

Po inkubaci s protilátkou byl gel přenesen do kolony (Econo-Column, 1 x 10 cm, 10 ml) nosič byl promýván pomocí 0,05 mol/l Tris/HCl pufrem obsahujícím 0,15 mol/l NaCl o pH 7,4 a v odebíraných frakcích (po 0,5 ml) byla měřena absorbance při 280 nm. Nosič byl promýván tak dlouho, dokud absorbance při 280 nm neklesla téměř k nule.

K eluci specificky adsorbovaných slepičích i králičích protilátek byl použit 0,05 mol/l diethylamin o pH 11,5. Eluční frakce byly jímány do mikrozkušavek obsahujících 1 mol/l citrátový pufr o pH 6,5 (200 µl), sloužícího k neutralizaci pH eluátu na hodnotu 7,2 až 7,4; byly jímány 0,5 ml frakce. Průběh chromatografie byl sledován měřením absorbance při 280 nm jednotlivých frakcí. Ověření afinitní purifikace bylo provedeno ELISA testem.

3.9 Dialýza

Roztok a materiál:

0,01 mol/l fosfátový pufr pH 7,3

dialyzační trubice – membrána zvířecího původu (střevo)

Postup:

Potřebná délka dialyzační trubice byla odstřižnuta a na jednom konci pevně uzavřena plastovým skřipcem, aby se zabránilo protečení. Připravený roztok se vzorkem, byl převeden pomocí stříkačky do trubice. Následně byl uzavřen druhý konec dialyzační trubice dalším skřipcem. Připravená dialyzační trubice byla vložena do kádinky, která obsahuje 0,01 mol/l fosfátový pufr pH, důležité aby celá dialyzační trubice byla ponořena, a konce trubice plavaly na povrchu hladiny, dialyzační trubice by se neměla ohýbat, je třeba vhodně volit velikost kádinky a množství pufru. Míchání a výměna pufru velmi zrychluje postup dialýzy, a pufr byl měněn 5krát.

3.10 Isolace vepřového pepsinogenu na koloně DEAE-celuloze

Roztoky:

vepřový homogenát

DEAE-celulosa

0,01 mol/l fosfátový pufr pH 7,3

0,6 mol/l NaCl ve 0,01 mol/l fosfátovém pufru pH 7,3

Postup:

Suchý ionex DEAE-celulosa byl ponechán nabobtnat. Ionex byl několikrát dekantován, bobtnání probíhalo 24 hodin. Kolona byla naplněna do 2/3 výšky připraveným ionexem. Část ionexu byla smíchána se vzorkem vepřového homogenátu, a ponechána přes noc míchat v chladové místnosti. Následně byl pak ionex se vzorkem nanesen na sloupec připraveného nosiče, a bylo prováděno promývání 0,01 mol/l fosfátovým pufrům pH 7,3, pak byl sloupec spojen s rezervoárem elučního roztoku a jímány frakce eluátu.

Byla použita gradientová eluce, plynulé změny ve složení elučního roztoku. Rezervoár pro lineární gradient byl tvořen dvěma nádobkami o stejném průměru spojenými hadičkami, jedna nádoba byl rezervoár, který obsahoval 0,6 M NaCl ve 0,01 M fosfátovém pufru pH 7,3 a druhá nádoba obsahující magnetické míchadlo

obsahovala roztok 0,01 M fosfátovém pufru pH 7,3, hladiny v roztoků v nádobkách byly vyrovnané.

Rechromatografie – jednotlivé vrcholy z předešlé chromatografie po odsolení byly naneseny na kolonu DEAE-celulose, a promývání a eluci byly použité stejné podmínky.

3.11 Odsolení vepřového pepsinogenu pomocí gelové chromatografie – Sephadex G-100

Roztoky:

vepřový pepsinogen (isolovaný na DEAE-celulose)

Sephadex G-100

0,005 mol/l fosfátový pufr pH 7,3

Postup:

Na odsolení vzorku vepřového pepsinogenu byl použit gel připravený bobtnáním Sephadexu G-100. Do skleněného sloupce bylo převedeno 60 ml gelu Sephadexu G-100. Následně bylo promyt 0,005 mol/l fosfátovým pufrem pH 7,3, a pak byl nanesen Pasterovou pipetou vepřový pepsinogen (10 ml). Kolona byla promývána 0,005 mol/l fosfátovým pufrem pH 7,3, a byly jímány frakce.

4. Výsledky

4.1 Isolace vepřového pepsinogenu z homogenátu vepřové sliznice

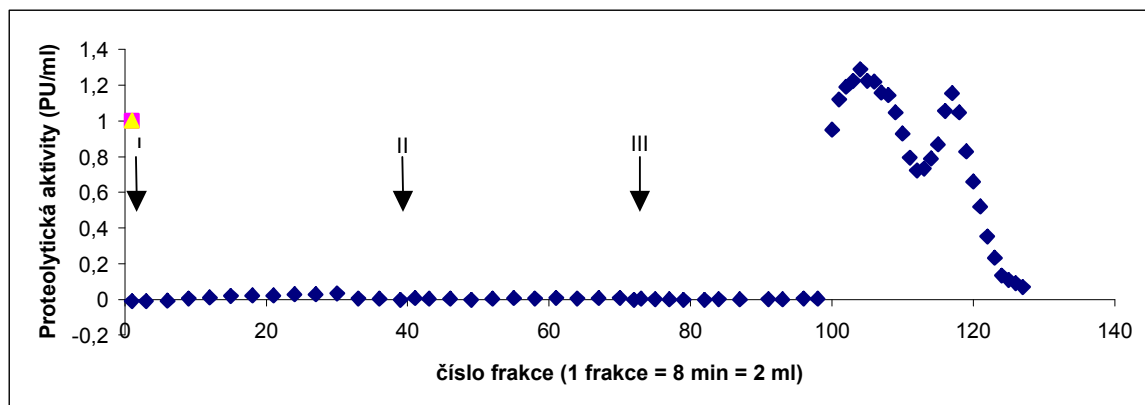
Většina dosud popsaných postupů pro izolaci a separaci pepsinů a pepsinogenů zahrnuje kombinaci chromatografických metod na principech iontově-výměnné a afinitní chromatografie, nebo opakovaně použité iontově-výměnné chromatografie. V této práci byla pro izolaci pepsinogenu použita opakovaná iontově-výměnná chromatografie na ionexu DEAE-celulose.

Na ionexu DEAE-celulose byl separován pepsinogen A z homogenátu vepřové sliznice (obr. 4.1) za podmínek nejvhodnějších pro separaci vepřového pepsinogenu A. Pro další zpracování byly uschovávány frakce č. 100 – 109 odpovídá vrchol I a č. 114 – 119 odpovídá vrchol II. Byla stanovena proteolytická aktivita enzymu modifikovanou metodou dle Ansona a Miského [45] a BCA metodou stanovena bílkovina [44] u každé druhé jímání frakce.

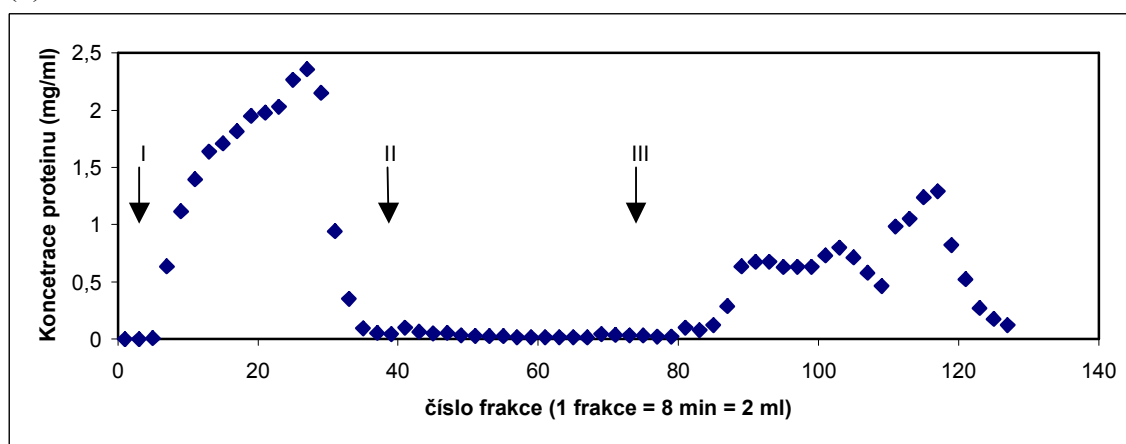
Dále byl zpracováván vrchol I, který byl dialyzován před dalším použitím. Byl nanesen na kolonu s nově připravenou DEAE-celulosou (obr. 4.2).

Část vzorku pepsinogenu byla podrobena gelové chromatografii na Sephadexu G-100. Došlo k lepšímu přečištění a odsolení vzorku (obr. 4.3).

(a)



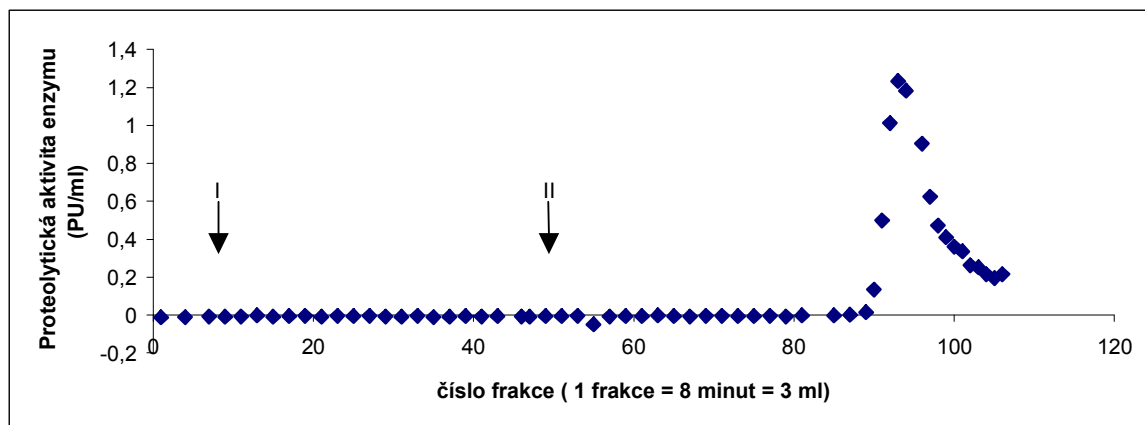
(b)



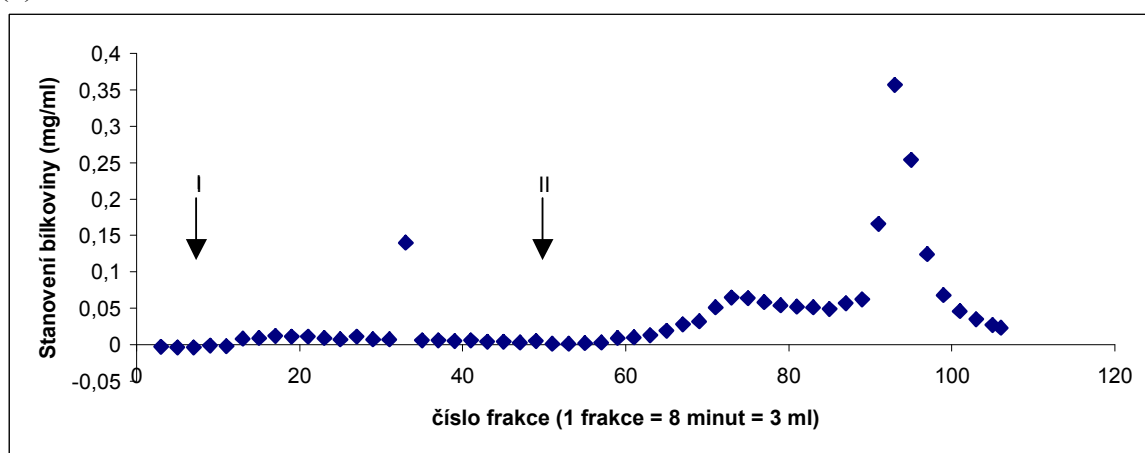
Obr. 4.1 Isolace vepřového pepsinogenu z homogenátu vepřové sliznice na koloně s DEAE-celulose (a) Stanovení proteolytické aktivity enzymu [45] u každé druhé jímáné frakce, (b) Stanovení bílkoviny BCA metodou [44] u každé druhé jímáné frakce.

Chromatografické podmínky: I – nanesen vzorek (homogenát vepřové sliznice s ionexem), II – promývání 0,01 mol/l fosfátovým pufr pH 7,3, III – gradientová eluce 0 – 0,6 mol/l NaCl v 0,01 mol/l fosfátovém pufru pH 7,3.

(a)



(b)

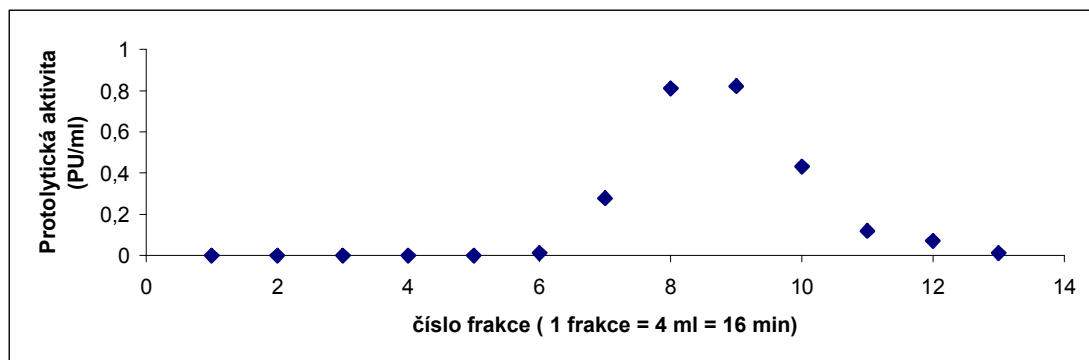


Obr. 4.2 Opakovaná iontově-výměnná chromatografie vrcholu I, který byl získán z prvním přečištění homogenátu vepřové sliznice na koloně DEAE-celulose

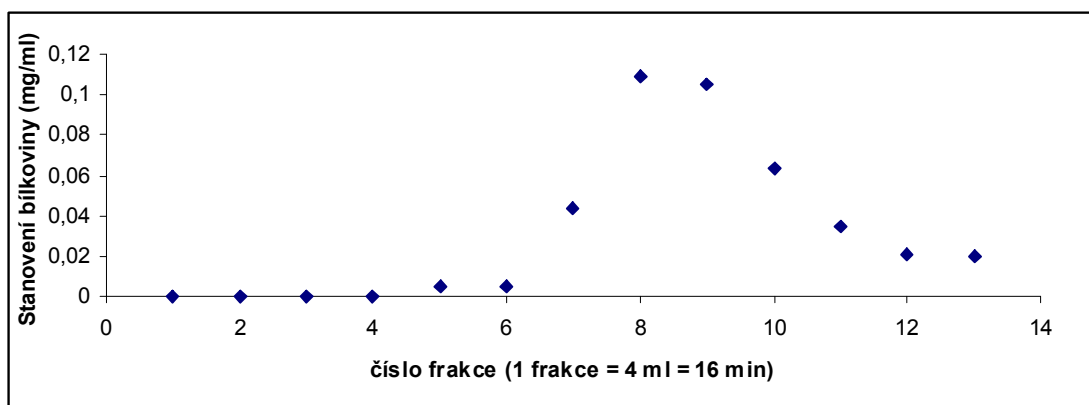
(a) Stanovení proteolytické aktivity enzymu modifikovanou metodou Ansona a Mirského [45] u každé druhé jímání frakce, (b) Stanovení bílkoviny BCA metodou [44] u každé druhé jímání frakce.

Chromatografické podmínky: I – nanesen vzorek (vrchol I), promýváno 0,01 mol/l fosfátovým pufr pH 7,3, II – gradientová eluce 0 – 0,4 mol/l NaCl v 0,01 mol/l fosfátovém pufru pH 7,3.

(a)



(b)

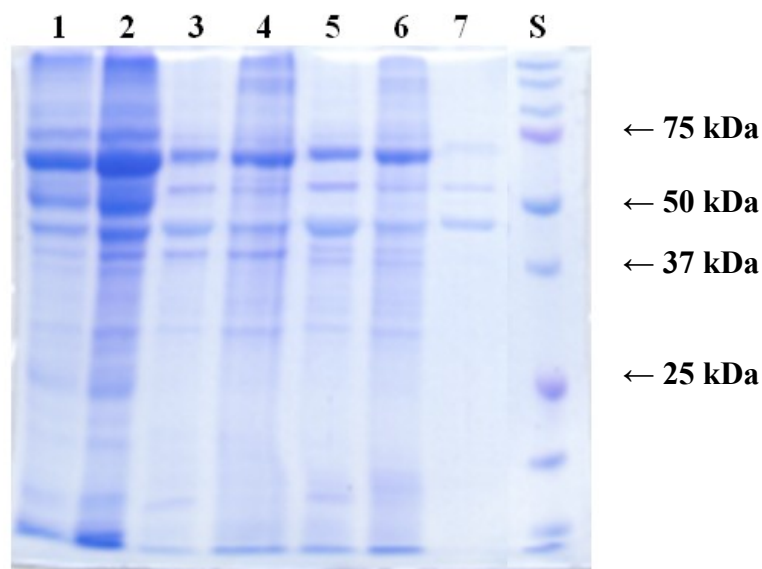


Obr. 4.3 Gelová chromatografie Sephadex G-100 vzorku vepřového pepsinogenu

(a) Stanovení proteolytické aktivity enzymu modifikovanou metodou dle Ansona a Miského [45], (b) Stanovení bílkoviny metodou BCA [44].

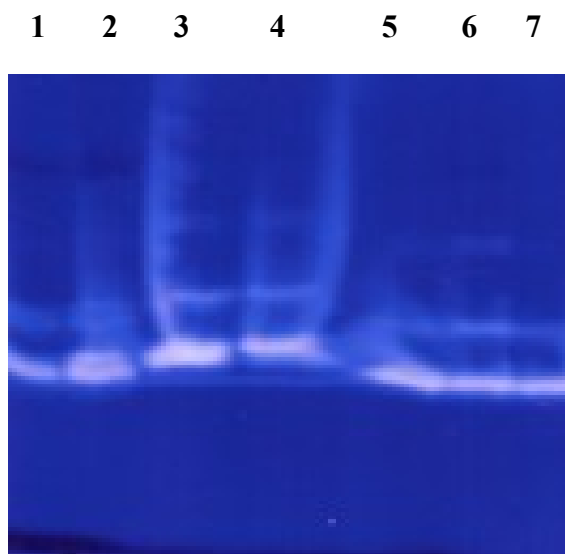
K výsledné identifikaci vepřového pepsinogenu byla použita SDS elektroforéza (obr. 4.4) (12% separační gel, 5% zaostřovací gel). Na gelu je vidět rozdíl mezi původním vzorkem, vepřový homogenát žaludeční sliznice a jednotlivých vrcholů I a II, před a po jejich dialýze, a vrchol po opakované chromatografii. Jednotlivé modré pruhy v gelu, které odpovídaly vzorku po opakované iontově-výměnné chromatografii, odpovídají BSA (~ 67 kDa) a PGA (~ 42,5 kDa), které byly obsaženy ve vzorku.

Jako další potvrzení izolace vepřového pepsinogenu byla použita nativní elektroforéza (obr. 4.5). Pepsinogeny se v gelu jevily jako bílé pruhy na modrém pozadí.



Obr. 4.4 SDS elektroforéza výsledné identifikaci vepřového pepsinogenu

Podmínky elektroforézy a detekce (příprava kap. 3.6.2): 1 – homogenát vepřové žaludeční sliznice 5x zředěný, 2 – homogenát vepřové žaludeční sliznice 2x zředěný, 3 – vrchol I, 4 – vrchol II, 5- vrchol I po dialýze, 6 – vrchol II po dialýze, 7 – vrchol I po opakované iontově-výměnné chromatografii, S – standard.



Obr. 4.5 Nativní elektroforéza výsledné identifikaci vepřového pepsinogenu

Podmínky nativní elektroforézy a detekce (příprava kap. 3.6.1): 1 – homogenát vepřové žaludeční sliznice 5x zředěný, 2 – homogenát vepřové žaludeční sliznice 2x zředěný, 3 – vrchol I, 4 – vrchol II, 5- vrchol I po dialýze, 6 – vrchol II po dialýze, 7 – vrchol I po opakované iontově-výměnné chromatografii.

4.2 Porovnání kontrolní a specifické IgY a IgG proti vepřovému pepsinogenu

Připravené protilátky firmou Hena,s.r.o. - slepičí IgY a králíčí IgG byly nejprve testovány ELISA testem, a to za použití antigenu, vepřového pepsinogenu, který byl použit na imunizaci. Postup imunizace viz kap. 3.3.

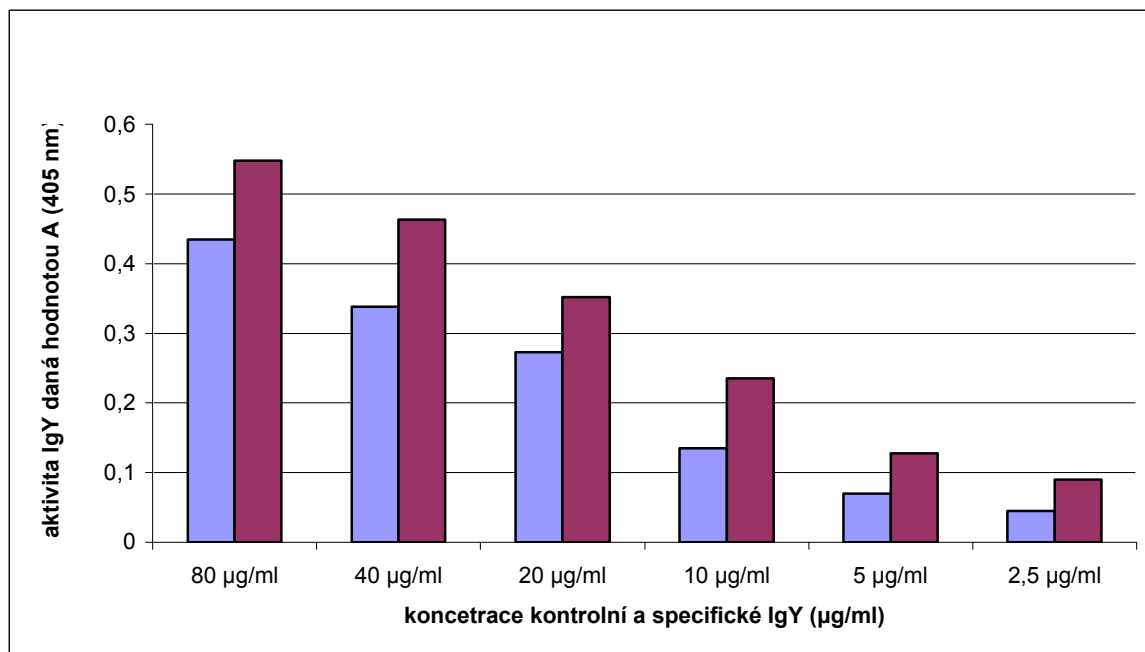
Obrázek 4.6 ukazuje výsledky ELISA testu příslušné aktivity IgY a IgG dány hodnotou A_{405nm} . Použitý antigen byl lyofilizát vepřového pepsinogenu, blokační roztok byl 2% roztok řídkého bílku. Použité roztoky protilátek IgY v koncentraci 80 – 2,5 μ g/ml (molární absorpční koeficient 1,094 ml/mg.cm) a králíčí sérum IgG ředění 10x – 10000x (molární absorpční koeficient 1,36 ml/mg.cm). Sekundární protilátka byla použita značená alkalickou fosfatasou.

Z výsledků lze vyhodnotit, že v případě slepičích protilátek proti vepřovému pepsinogenu není velký rozdíl mezi kontrolní (pre-imunní) a specifickou protilátkou proti vepřovému pepsinogenu..

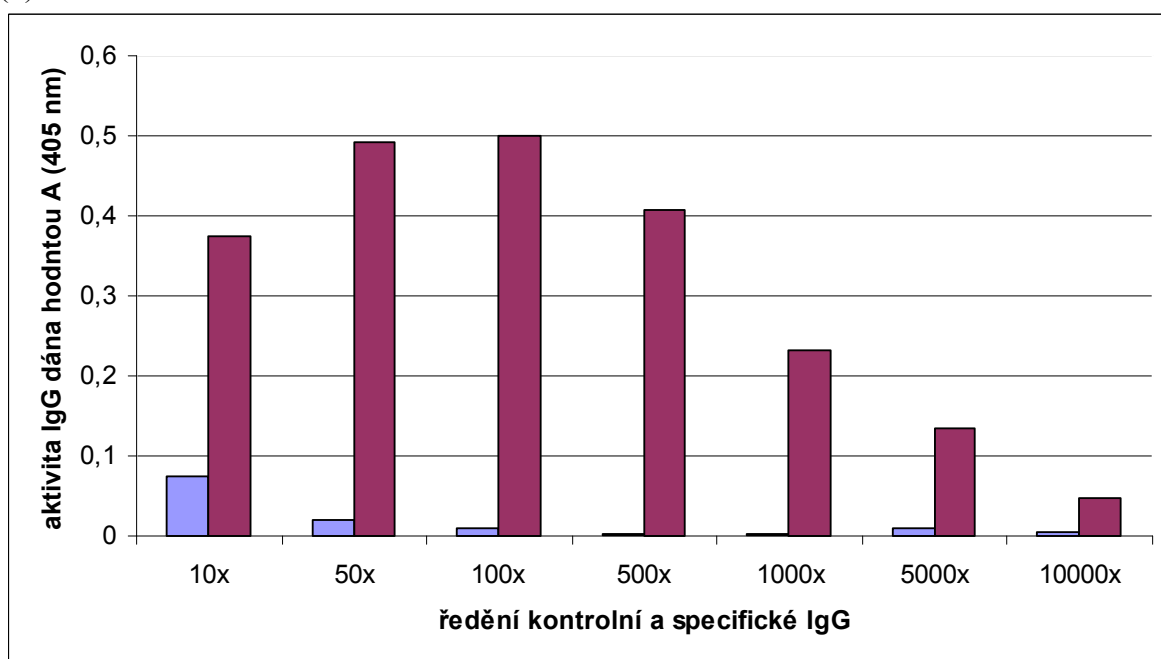
Oproti tomu v případě králíčích protilátek tomu tak není, v kontrolním séru nejsou protilátky proti vepřovému pepsinogenu.

Tento výsledek ukazuje na rozdílnosti protilátek IgY a IgG, i když k imunizaci byl použit stejný antigen, vepřový pepsinogen.

(a)



(b)



Obr. 4.6 ELISA test – porovnání kontrolní a specifické protilátky proti vepřovému pepsinogenu slepičí IgY a králíčí IgG

Podmínky experimentu: antigen – vepřový PGA, blokační roztok – řídský bílek, sekundární protilátka značená alkalickou fosfataseou.

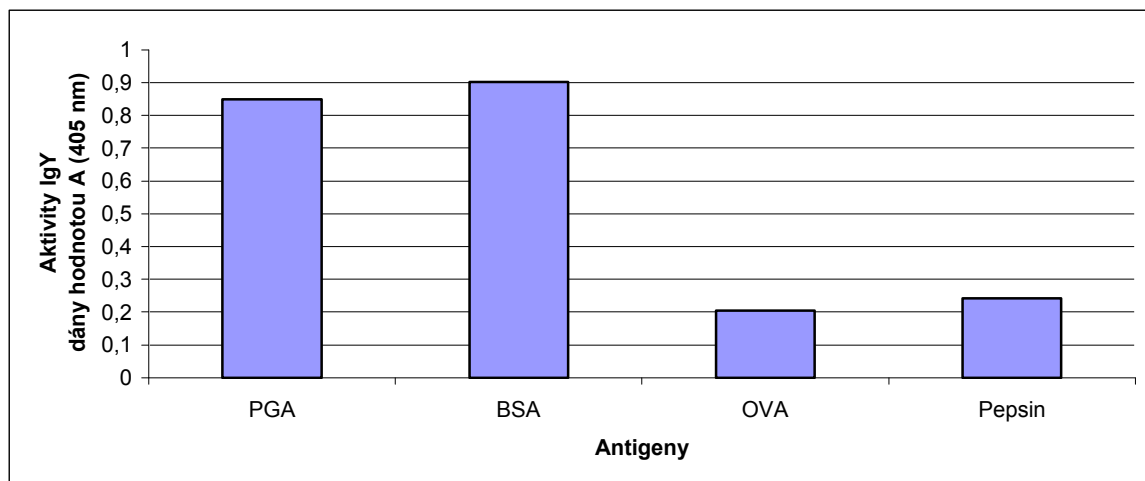
- Kontrolní a specifická slepičí protilátka proti vepřovému pepsinogenu IgY, měřeno po 25 minutách po přidání vyvolávacího roztoku
- Kontrolní a specifické králíčí sérum proti vepřovému pepsinogenu IgG, měřeno po 10 minutách po přidání vyvolávacího roztoku

4.3 ELISA test - IgY a IgG a použití různých antigenů

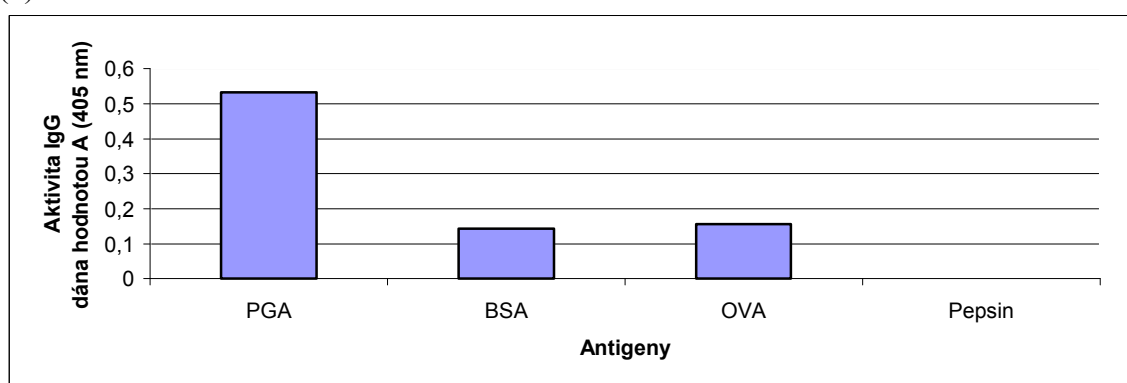
K dalšímu porovnání protilátek IgY a IgG proti vepřovému pepsinogenu byl použit ELISA test, a to s použitím i jiných antigenů (obr. 4.7). Jako antigeny bylo použito vepřový pepsinogen, hovězí albumin (BSA), ovalbumin (OVA), pepsin A (Sigma-Aldrich). Blokovací roztok byl použit 2% roztok ředkého bílku a sekundární protilátka značená alkalickou fosfátasou.

V případě tohoto výsledku ELISA testu jsou vidět opět rozdíly mezi slepičí IgY a králičí IgG. Specifická slepičí IgY dokonce poskytuje BSA aktivitu vyšší než vepřový pepsinogen. Králičí IgG poskytuje signál pro BSA čtvrtinový k vepřovému pepsinogenu. Protilátka IgY reaguje s pepsinem A třetinovým signálem oproti vepřovému PGA, ale králičí IgG nereaguje.

(a)



(b)



Obr. 4.7 ELISA test – IgY a IgG a použití různých antigenů

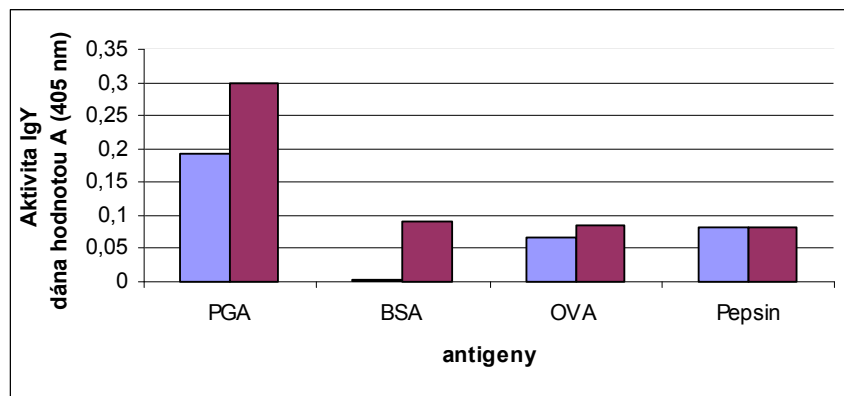
Podmínky experimentu: antigeny – vepřový PGA, hovězí albumin (BSA), ovalbumin (OVA), pepsin A. Blokovací roztok - 2% roztok řídkého bílku, sekundární protilátka značená alkalickou fosfatasou.

- (a) Slepičí specifická protilátka proti vepřovému pepsinogenu IgY – koncentrace primární protilátky 80 µg/ml.
- (b) Králičí krevní sérum specifická proti vepřovému pepinogenu IgG – primární protilátka ředěna 100x.

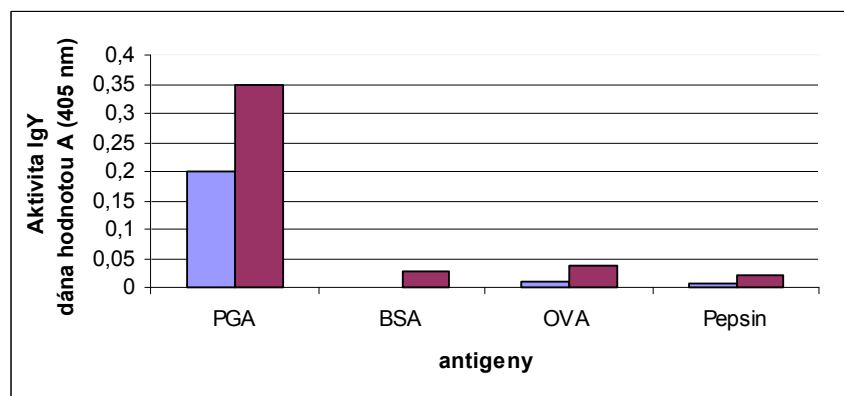
4.4 IgY a IgG proti vepřovému PGA a různé blokační roztoky v ELISA testu

K optimalizaci podmínek stanovení PGA za použití testu ELISA a to pomocí připravených protilátek slepičích IgY (obr. 4.8) a králičích IgG (obr. 4.9) bylo prováděno porovnání různých blokačních roztoků. Byly vždy použity 2% roztoky, a to řídkého bílku, želatiny z rybích kůží a ovalbuminu.

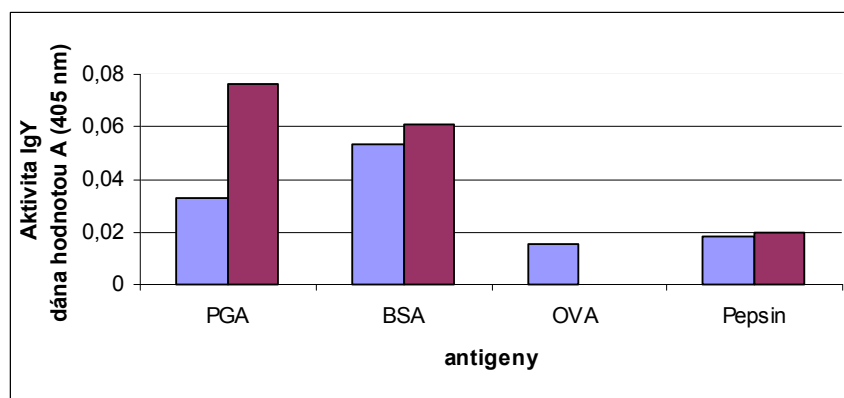
(a)



(b)



(c)

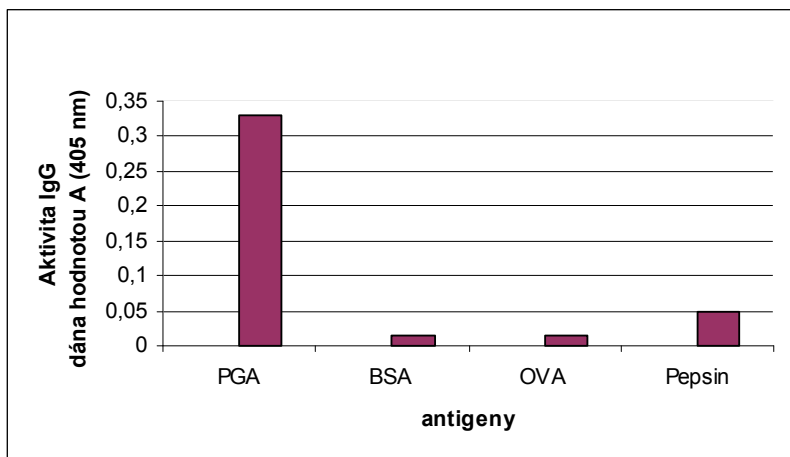


Obr. 4.8 IgY proti vepřovému PGA a různé blokační roztoky v ELISA testu

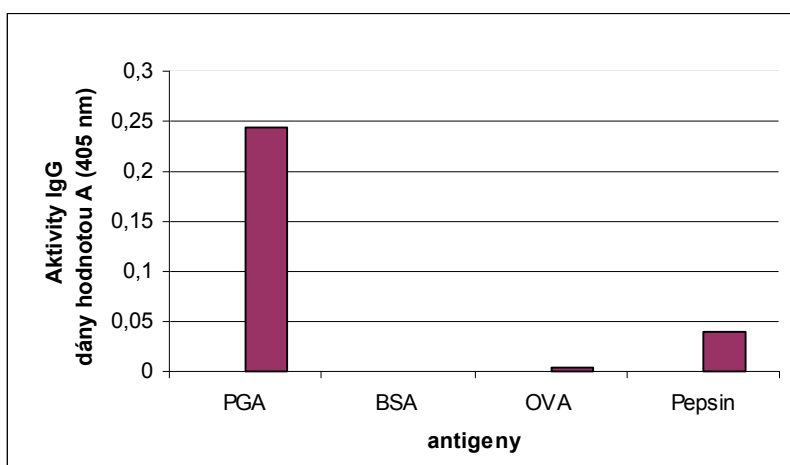
Podmínky experimentu: antigeny – vepřový PGA, BSA, OVA, pepsin A. Primární protilátka – kontrolní (pre- imunní) a specifická slepičí IgY proti vepřovému pepsinogenu. Měřeno po přidání vyvolávacího roztoku po 20 minutách.

Použity blokační roztoky: (a) ovalbumin, (b) želatina z rybích kůží, (c) řídký bílek.

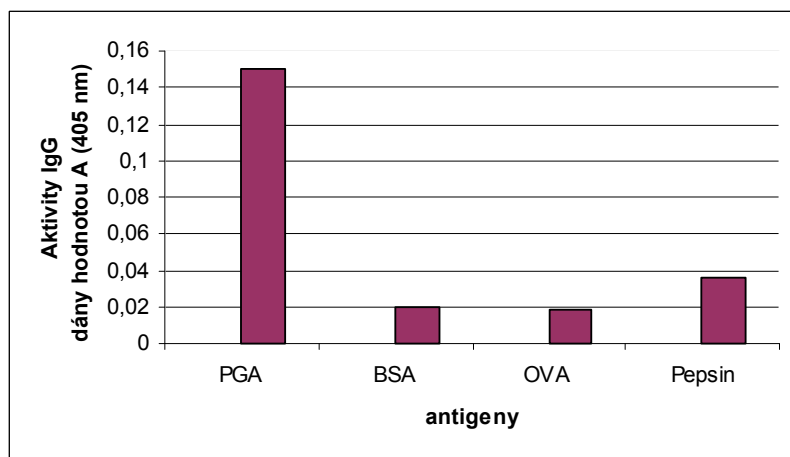
(a)



(b)



(c)



Obr. 4.9 IgG proti vepřovému PGA a různé blokační roztoky v ELISA testu

Podmínky experimentu: antigeny – vepřový PGA, BSA, OVA, pepsin A. Primární protilátka – **kontrolní** (pre-imunní) a **specifická** slepičí IgG proti vepřovému pepsinogenu. Měřeno po přidání vyvolávacího roztoku po 10 minutách.

Použity blokační roztoky: (a) ovalbumin, (b) želatina z rybích kůží, (c) ředký bílek.

Z tohoto experimentu lze vyhodnotit, že blokační roztok ze želatiny z rybích kůží je nejvhodnější pro obě protilátky jak pro slepičí IgY, tak pro králičí IgG.

Z toho ELISA testu lze vyhodnotit, že použití blokačního roztoku lyzátu z rybích kůží a slepičích IgY proti vepřovému pepsinogenu získáváme výrazný signál pro antigen vepřový pepsinogen oproti ostatním zkoušeným blokačním roztokům.

V případě králičí IgG se potvrdilo, že změnou blokačního roztoku dosáhneme změnu výšky signálu pro vepřový pepsinogen, ale pro ostatní zkoušené antigeny to nezpůsobilo zásadní ovlivnění.

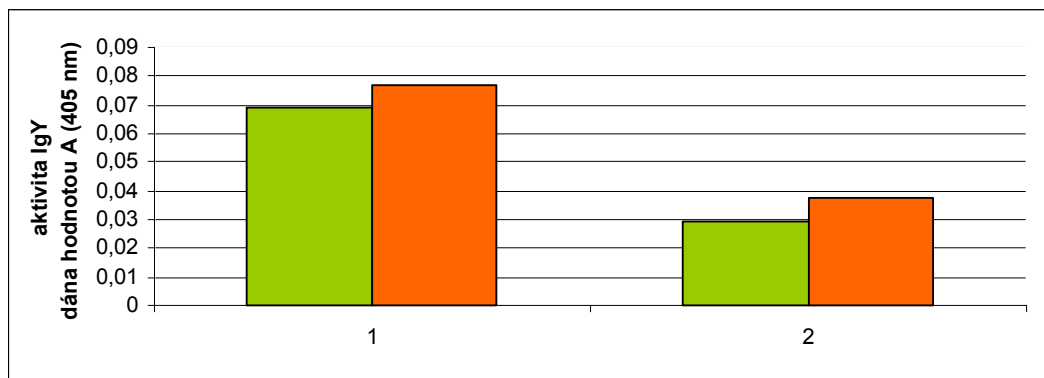
4.5 Afinitní purifikace IgY a IgG na sloupci Sepharosy s imobilizovaným hovězím sérovým albuminem

Z předchozí práce vyplývá, že byly připraveny slepičí protilátky, vytvořené imunizací slepice vepřovým pepsinogenem. V další část práce byla věnována izolaci těchto protilátek, a touto možností získat přečištěné protilátky proti vepřovému pepsinogenu.

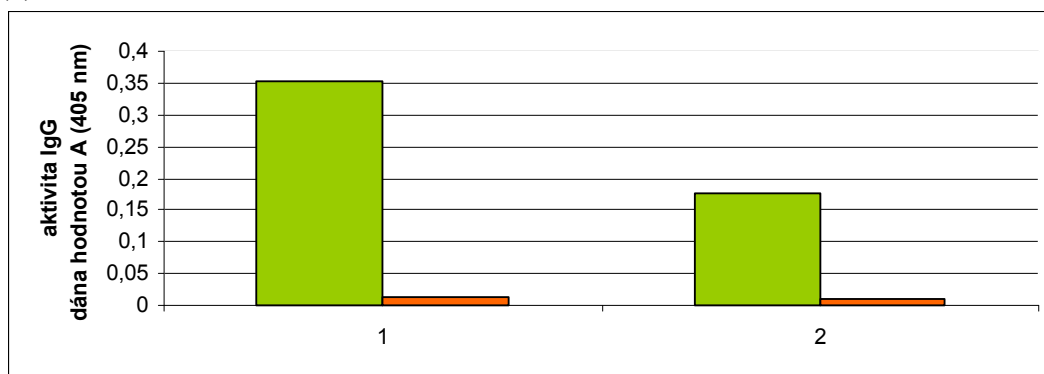
Na CNBr- aktivovanou Sepharosu 4B byl imobilizován hovězí sérový albumin 19 mg na 5 ml gelu. Pro separaci slepičích a králičích protilátek byly naplněny dvě kolonky (10 x 1 cm, 2,5 ml gelu). Afinitní chromatografií na BSA-Sepharose byly získány dvě frakce protilátek: 1. frakce, která se na sloupec Sepharosy s imobilizovaným BSA neadsorbovala a 2. frakce proteinů interagujících s imobilizovaným proteinem. Frakce eluované roztokem diethylaminu byly jímány do zkumavek obsahujících 1 mol/l citrátový pufr při pH 6,5.

Na obr. 4.10 je ukázán výsledek ELISA testu, který byl použit na ověření purifikace protilátek. V případě tohoto výsledku je vidět, že se afinitní purifikace nezdařila, nepodařilo se eluovat izolované protilátky IgY proti sérovému hovězímu albuminu. Ve všech frakcích, které byly získány byla vždy směs protilátek proti vepřovému pepsinogenu a hovězímu albuminu. V případě IgG se afinitní chromatografie na BSA-Sepharose zdařila.

(a)



(b)



Obr. 4.10 ELISA test - Afinitní purifikace IgY a IgG na sloupci Sepharosy s imobilizovaným hovězím sérovým albuminem

Podmínky experimentu: Antigen – **vepřový pepsinogen**, **hovězí sérový albumin**, blokovací roztok – řídký bílek, sekundární protilátka značená alkalickou fosfátasou.

- (a) Slepičí specifická protilátka: 1 - IgY, která byla nanášena na kolonu, o koncentraci 40 µg/ml, 2 – IgY, která byla eluována z kolony Sepharosy s imobilizovaným hovězím sérovým albuminem, o koncentraci 40 µg/ml. Měření provedeno po 25 minutách po přidání vyvolávacího roztoku.
- (b) Králičí specifická protilátka: 1 - IgG, která byla nanášena na kolonu, o koncentraci 20 µg/ml, 2 – IgG, která byla eluována z kolony Sepharosy s imobilizovaným hovězím sérovým albuminem, o koncentraci 15 µg/ml. Měření provedeno po 25 minutách po přidání vyvolávacího roztoku.

4.6 Afinitní purifikace IgY a IgG na sloupci Sepharosy s imobilizovaným vepřovým pepsinogenem

Po neúspěšné purifikaci IgY na sloupci Sepharosy s imobilizovaným sérovým hovězím albuminem byla zkoušena purifikace na sloupci Sepharosy s imobilizovaným vepřovým pepsinogenem.

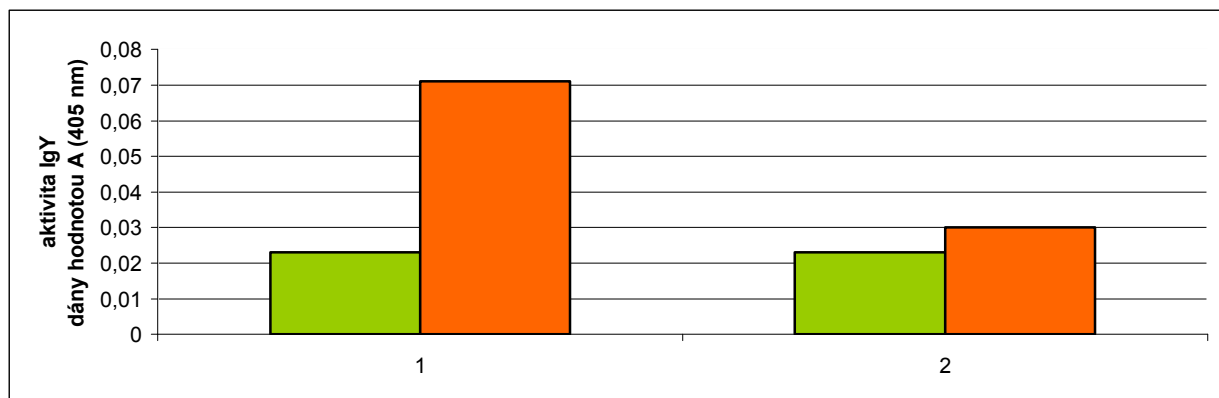
Na CNBr- aktivovanou Sepharosu 4B byl imobilizován vepřový pepsinogen (15 mg na 3,5 ml gelu). Afinitní chromatografií na vepř. PGA-Sepharose byly získány dvě frakce protilátek: 1. frakce, která se na sloupec Sepharosy s imobilizovaným vepř. PGA neadsorbovala a 2. frakce proteinů interagujících s imobilizovaným proteinem. Frakce

eluované roztokem diethylaminu byly jímány do zkumavek obsahujících 1 mol/l citrátový pufr při pH 6,5.

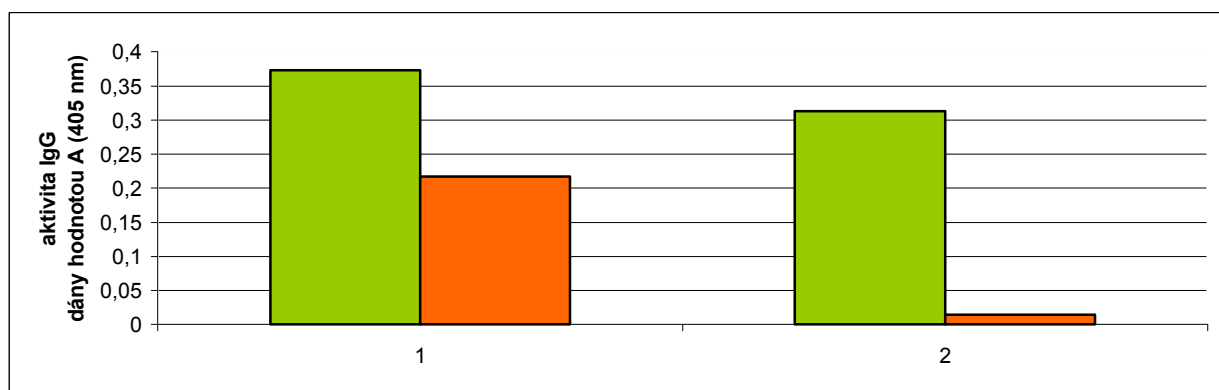
Na obr. 4.11 je znázorněn výsledek ELISA testu, který byl použit na ověření purifikace protilátek. Z výsledku je vidět, že afinitní purifikace v případě IgY se nezdařila, sice se podařilo eluovat protilátky proti vepřovému pepsinogenu, ale s tím i část protilátek proti hovězímu albuminu. V případě IgG se afinitní purifikace na sloupci Sepharosy s imobilizovaným vepřovým pepsinogenem se naopak zdařila.

Byla provedena SDS elektroforéza, na které je možné vidět jednotlivé purifikační kroky u IgY a IgG (obr.4.12). Byly nanесeny vzorky původní protilátky IgY a IgG, dále po purifikaci na sloupci Sepharosy s imobilizovaným hovězím albuminem a také po purifikaci na sloupci Sepharosy s imobilizovaným vepřovým pepsinogenem. Tato elektroforéza byla dále použita pro měření hmotnostního spektra.

(a)



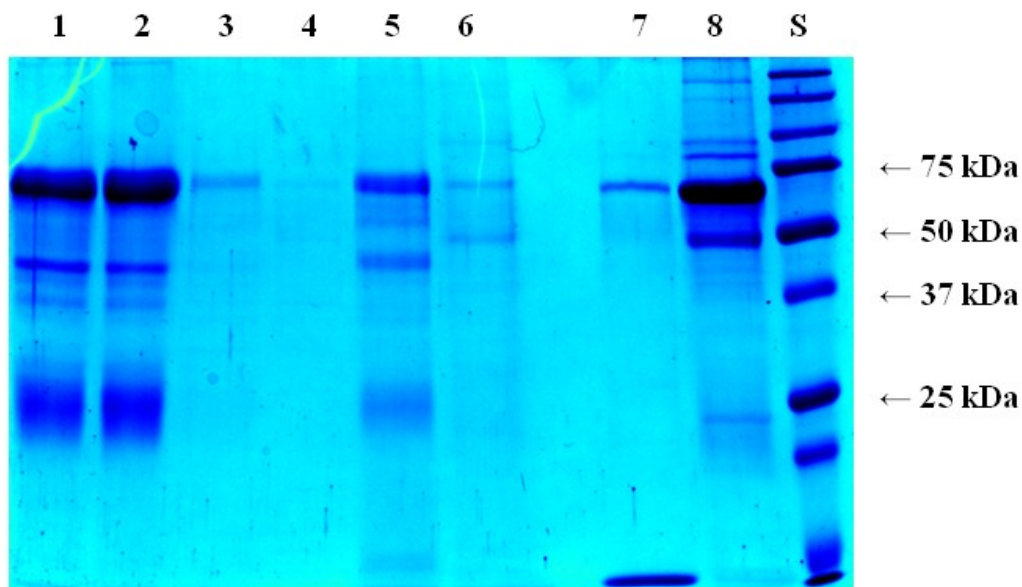
(b)



Obr. 4.11 ELISA test - Afinitní purifikace IgY a IgG na sloupci Sepharosy s imobilizovaným vepřovým pepsinogenem

Podmínky experimentu: Antigen – vepřový pepsinogen, hovězí sérový albumin, blokovací roztok – řídký bílek, sekundární protilátka značená alkalickou fosfatase.

- (a) Slepičí specifická protilátka: 1 - IgY, která byla nanášena na kolonu, o koncentraci 20 µg/ml, 2 – IgY, která byla eluována z kolony Sepharosy s imobilizovaným hovězím sérovým albuminem, o koncentraci 20 µg/ml. Měření provedeno po 25 minutách po přidání vyvolávacího roztoku.
- (b) Králičí specifická protilátka: 1 - IgG, která byla nanášena na kolonu, o koncentraci 80 µg/ml, 2 – IgG, která byla eluována z kolony Sepharosy s imobilizovaným hovězím sérovým albuminem, o koncentraci 20 µg/ml. Měření provedeno po 25 minutách po přidání vyvolávacího roztoku.



Obr. 4.12 SDS-PAGE: IgY a IgG a jejich purifikace na Sepharose s imobilizovaným hovězím albuminem a vepřovým pepsinogenem

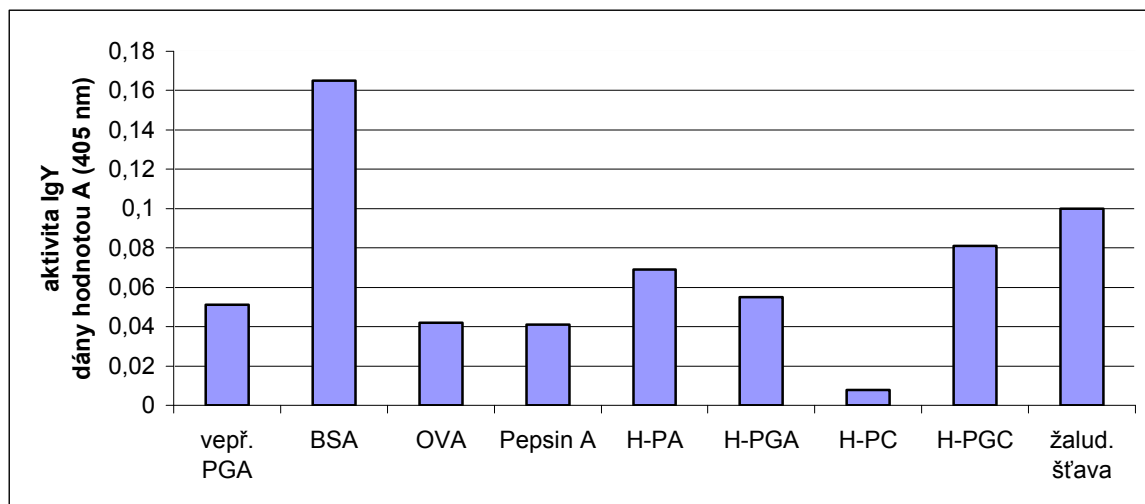
1- pre-imunní IgY, 2- specifická IgY proti vepřovému pepsinogenu, 3- specifická IgY proti vepřovému pepsinogenu po purifikaci na Sepharose s imobilizovaným hovězím albuminem, 4- specifická IgG proti vepřovému pepsinogenu po purifikaci na Sepharose s imobilizovaným hovězím albuminem, 5- specifická IgY proti vepřovému pepsinogenu po purifikaci na Sepharose s imobilizovaným vepřovým pepsinogenem, 6- specifická IgG proti vepřovému pepsinogenu po purifikaci na Sepharose s imobilizovaným vepřovým pepsinogenem, 7- pre-imunní králičí IgG, 8- specifické králičí krevní sérum IgG proti vepřovému pepsinogenu.

4.7 ELISA test IgY proti lidskému pepsinogenu A a pepsinogenu C

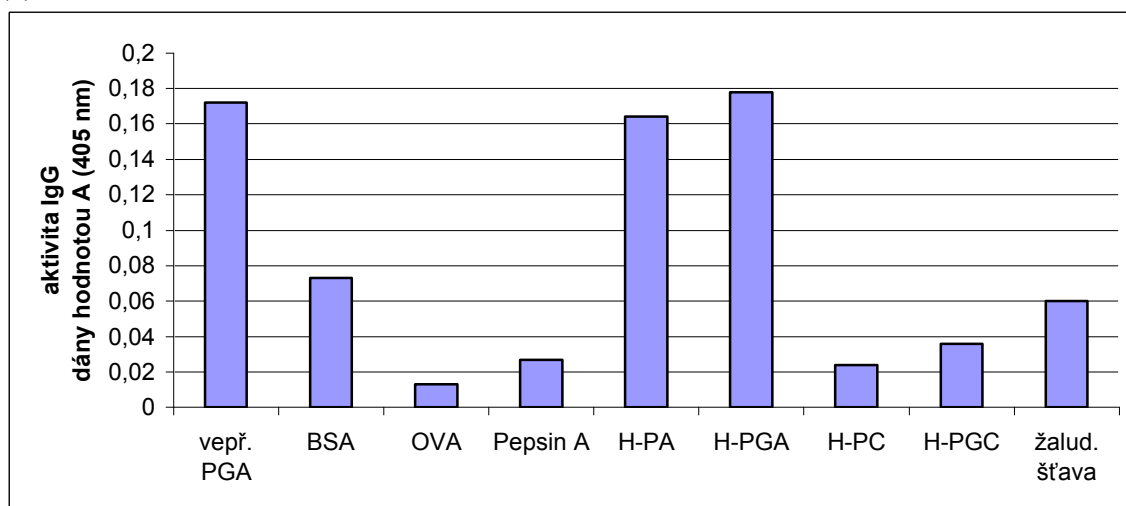
Pro ověření použití slepičích IgY pro použití v diagnostice rakoviny žaludku byly připraveny protilátky proti lidskému pepsinogenu A a pepsinogenu C. Byl proveden ELISA test (obr.4.13), ve kterém byly vyzkoušeny různé antigeny, jednak vepřový pepsinogen, komerčně dostupný hovězí albumin, ovalbumin, hovězí pepsin A, lidské vzorky: pepsin A, pepsin C, pepsinogen A a pepsinogen C a lidská žaludeční šťáva. Výsledky jsou vyhodnocované jako aktivita IgY proti lidskému pepsinogenu A a pepsinogenu C specifická, od které je odečtena hodnota aktivity IgY proti lidskému pepsinogenu A a pepsinogenu C získána při použití kontrolní (pre-imunní) protilátky.

Z výsledku ELISA testů (obr. 4.13) vyplývá, že slepičí IgY nejsou vhodné pro diagnostické určení podílu pepsinogenu A a pepsinogenu C.

(a)



(b)



Obr. 4.13 ELISA test: slepičí IgY proti lidskému pepsinogenu A (a) a lidskému pepsinogenu C (b)

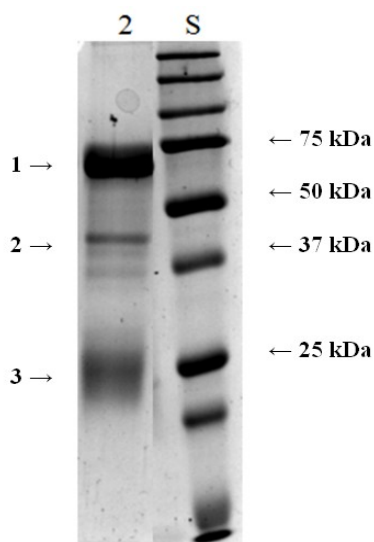
Experimentální podmínky: antigeny – vepřový pepsinogen (vepř. PGA), sérový hovězí albumin (BSA), ovalbumin (OVA), hovězí pepsin A (pepsin A, Sigma-Aldrich), lidský pepsin A (H-PA), lidský pepsinogen (H-PGA), lidský pepsin C (H-PC), lidský pepsinogen C (H-PGC), žaludeční šťáva, blokovací roztok – řídký bílek, sekundární protilátka značená alkalickou fosfatázou. Měřeno po 25 minutách po přidání vyvolávacího roztoku.

4.8 MALDI-TOF MS/MS analýza IgY a IgG

Pro identifikaci proteinových zón slepičí IgY a králičí IgG byly zóny z gelu (obr. 4.12) vyříznuty a proteiny proteolyticky štěpeny pomocí trypsinu. Poté byly peptidy ze zón 1 až 3 podrobeny MALDI-TOF MS/MS analýze. Tuto analýzu prováděl RNDr. Petr Přikryl, Ph.D..

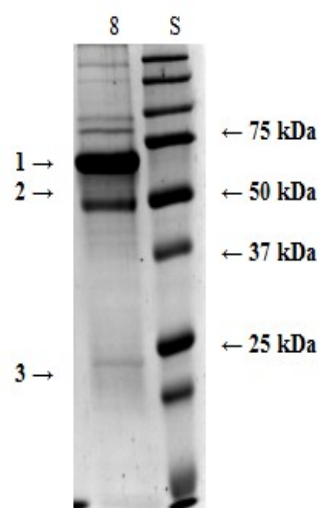
MALDI-TOF MS/MS analýza slepičích IgY (obr. 4.14) potvrdila, že proteinová zóna 1 přísluší těžkému řetězci protilátky IgY, *Gallus gallus* a proteinová zóna 3 přísluší lehkému řetězci protilátky IgY, *Gallus gallus*. Zároveň bylo zjištěno, že peptidy získané ze zóny 2 odpovídají sérovému albuminu, *Gallus gallus*.

MALDI-TOF MS/MS analýza králičích IgY (obr. 4.15) potvrdila, že proteinová zóna 2 přísluší těžkému řetězci protilátky IgG, *Oryctolagus cuniculus* a proteinová zóna 3 přísluší lehkému řetězci protilátky IgG, *Oryctolagus cuniculus*. Zároveň bylo zjištěno, že peptidy získané ze zóny 1 odpovídají sérovému albuminu, *Oryctolagus cuniculus*.



Obr. 4.14 Výřez dráhy 2 z obr. 4.12 příslušející specifické protilátce IgY proti vepřovému pepsinogenu

Zóny 1 až 3 byly z gelu vyříznuty, zpracovány a MALDI TOF MS/MS analýzou bylo určeno proteinové složení jednotlivých zón.



Obr. 4.15 Výřez dráhy 8 z obr. 4.12 příslušející specifické protilátce IgG proti vepřovému pepsinogenu

Zóny 1 až 3 byly z gelu vyříznuty, zpracovány a MALDI TOF MS/MS analýzou bylo určeno proteinové složení jednotlivých zón.

5. Diskuse

Úkolem předkládané diplomové práce bylo porovnat vlastnosti specifických protilátek proti prasečímu pepsinogenu získaných z vaječného žloutku po imunizaci slepic (IgY) se specifickým králičím anti-serem získaným po imunizaci týmž antigenem. Vlastnosti těchto specifických protilátek pak byly porovnány s pre-immunními (kontrolními) vzorky získanými od stejných slepic anebo králíka před imunizací.

Slepičí protilátky (IgY) představují alternativní zdroj protilátek, které v řadě případů jsou velmi výhodné. Označení IgY (ang. yolk = žloutek) bylo zavedeno Leslie a Clemem [61], protože některé vlastnosti těchto protilátek se od živočišných odlišovaly.

Velkou výhodou slepičích protilátek je jejich množství. I když průměrná koncentrace imunoglobulinů ve žloutku (10–25 mg/ml) je nižší než u živočichů (u králíka 35 mg IgG/ml) [46], každodenní produkce vajíčka tuto skutečnost překonává (25 g IgY za rok). Tato skutečnost nás mimo jiné vedla k tomu, abychom se pokusili připravit slepičí protilátky: například imobilizace protilátek na různá media vyžaduje větší množství těchto látek, a tím umožňuje daleko širší jejich uplatnění. Relativně nenáročná produkce IgY je předurčuje pro profylaxi a pasivní imunisaci [62,63,64].

Dále slepičí protilátky se tvoří odpověď proti většímu počtu antigenních epitopů ve srovnání se savčími protilátkami. Tato skutečnost vede k zvýšenému signálu a větší citlivosti u imunochemických metod.

IgY vykazuje jen velmi malou schopnost vázat se na protein A a protein G, což ukazuje na skutečnost, že tyto látky se neuplatňují při IgY separaci. Protože těžký řetězec IgY je o jednu konstantní domenu větší než u IgG, jeho rel. hmotnost stanovená pomocí SDS-polyakrylamidové elektroforesy vzrůstá až do 64 000; rel. mol. Hmotnost lehlé podjednotky je kolem 28 000 [46].

V našich pokusech relativní molekulová hmotnost podjednotek slepičí protilátky proti prasečímu pepsinogenu byla určena 62 500, což odpovídá těžkému řetězci IgY a 27 000, což odpovídá lehkému řetězci IgY.

Imunodiagnostika v klinické chemii představuje další velký podíl uplatnění slepičích protilátek IgY. Například v tomto případě vysoké titry proti konzervovaným

savčím antigenům a žádná reaktivita s reumatoidním faktorem a Fc receptory hrají velkou roli, apod.

To byly všechny důvody, které nás vedly k tomu, že slepičí protilátky proti prasečímu a později i lidskému pepsinogenu budou úspěšné. Nicméně naše výsledky ukázaly, že tomu tak není. Z výsledků vyplývá, že v případě slepičích protilátek proti vepřovému pepsinogenu není velký rozdíl mezi kontrolní (pre-imunní protilátka získaná před imunizací) a specifickou protilátkou proti prasečímu pepsinogenu. Oproti tomu, v případě králíčích protilátek tomu tak není: v kontrolním séru nejsou protilátky proti vepřovému pepsinogenu. K tomu, aby se vysvětlil důvod přítomnosti protilátek proti prasečímu pepsinogenu v kontrolní pre-imunní protilátce bude potřeba ještě další experimenty. Obdobná situace byla pozorována i u hovězího sérového albuminu.

Získané slepičí protilátky byly dále purifikovány na dvou afinitních nosičích: na vepřovém pepsinogenu-Sepharose a BSA-Sepharose. Vzhledem k tomu, že imunogen, kterým byly slepice imunizovány, obsahoval jak BSA tak vepřový pepsinogen, měly by se přítomné protilátky specifické pro imobilizovaný vepřový pepsinogen nebo imobilizovaný BSA adsorbovat. Silná interakce s těmito antigeny byla pozorována jak v případě frakce neadsorbované tak i adsorbované na oba dva typy afinitních nosičů: vepřový pepsinogen-Sepharosa a BSA-Sepharosa.

Zajímavé chování hovězího sérového albuminu a jeho maleylovaného derivátu, popsal ve své diplomové práci J. Benýšek [68]. Silná interakce s těmito antigeny byla pozorována jak v případě frakce neadsorbované tak i adsorbované na α -kasein-Sepharosu.

Schopnost slepičí protilátky, která se na imobilizovaný α -kasein adsorbovala, interagovat s hovězím sérovým albuminem a jeho derivátem pozorovala také T. Emmerová [69], i když v jejím případě protilátky byly získány imunizací slepic imunogenem, který neobsahoval BSA, ale KLH (keyhole limpet hemocyanin).

Nicméně, důvod proč protilátky rozpoznávající hovězí sérový albumin se adsorbují na imobilizovaný prasečí pepsinogen je prozatím obtížné vysvětlit.

6. Závěr

Byl izolován vepřový pepsinogen z homogenátu žaludeční sliznice na koloně DEAE-celulose, následně pak ještě přečištěn pomocí gelové chromatografie. Izolovaný vepřový pepsinogen byl používán jako modelová bílkovina lidskému pepsinogenu A.

Připravený vepřový pepsinogen byl použit na imunizaci slepic, ze žloutků byly získány imunoglobulinové frakce. Stejný antigen byl použit i v případě získání králičích protilátek.

Specifita získaných protilátek byla testována pomocí testu ELISA. Bylo zjištěno, že v případě slepičí protilátky vepřový pepsinogen sice rozpoznávají, ale projevují afinitu k tomuto antigenu už před imunizací. V případě králičích protilátek bylo zjištěno, že rozpoznávají vepřový pepsinogen A, tudíž jsou vhodné pro diagnostické určení pepsinogenu A.

Z výsledků ELISA testu, kde byly použity jiné antigeny, bylo zjištěno, že v případě sérového hovězího albuminu je v případě slepičích protilátek proti vepřovému pepsinogenu aktivita srovnatelná jako u vepřového pepsinogenu. Dále byly slepičí protilátky purifikovány pomocí afinitní chromatografie na CNBr-Sepharose s imobilizovaným hovězím sérovým albuminem, nebo vepřovým pepsinogem. Stejný postup byl proveden i u králičích protilátek. V případě slepičích protilátek nebyly získány izolované protilátky proti vepřovému pepsinogenu, u králičích protilátek se zdařilo získat purifikované protilátky proti vepřovému pepsinogenu, což bylo potvrzeno ELISA testem.

Při optimalizaci metody ELISA v případě použití slepičích a králičích protilátek proti vepřovému pepsinogenu byl vyhodnocen nejvhodnější blokační roztok lyzát z rybích kůží.

Rozdíl mezi slepičí IgY a králičí IgG protilátkou byl potvrzen pomocí MALDI-TOF MS analýzy.

Byl proveden ELISA test slepičích IgY proti lidskému pepsinogenu A a slepičích IgY proti lidskému pepsinogenu C. Byly použity izolovaný pepsinogen A a pepsinogen z lidské žaludeční šťávy jako antigeny. Z výsledku testu je vidět, že slepičí protilátky nejsou vhodné pro diagnostické určení podílu pepsinogenu A a pepsinogenu C.

7. Seznam použité literatury

- [1] Gritti I., Banfi G., Roi G.S.: Pharmacol. Res. 41 (2000) 265-281.
- [2] Fusek M., Vetvicka V.: *Aspartic Proteinases*. CRC Press, Houston 1995.
- [3] Karlson P., Gerok W., Gross W.: *Pathobiochemie*. Academia, Praha 1987
- [4] Samloff I.M.: Gastroenterology 96 (1989) 586-595.
- [5] Kageyama T.: Cell. Mol. Life Sci. 59 (2002) 288-306.
- [6] Ryle A. P., Hamilton M. P.: Biochem. J. 101 (1966) 176-183.
- [7] Nielsen P. K., Foltmann B.: Arch. Biochem. Biophys. 322 (1995) 417-422.
- [8] Muto N., Murayama K., Akahane K., Tani S.: J. Biochem. 87 (1980) 717-723.
- [9] Kageyama T., Takahashi K.: J. Biol. Chem. 261 (1986) 4395-4405.
- [10] Kageyama T., Takahashi K.: J. Biol. Chem. 261 (1986) 4406-4419.
- [11] Kageyama T., Tanabe K., Koiwai O.: Eur. J. Biochem. 202 (1991) 205-215.
- [12] Majerčáková P., Kučerová Z., Desvaux F. X., Peltre G.: Electrophoresis 21, 2919-2924 (2000).
- [13] Athauda S.B., Tanji M., Kageyama T., Takahashi K.: J. Biochem. 106 (1989) 920-927.
- [14] Bohak Z.: J. Biol. Chem. 244 (1969) 4638-4648.
- [15] Foltmann B.: v knize: Pepsinogens in Man (Kreuning J., Samloff I.M., Rotter J., Eriksson A. W. eds.) Alan R. Liss, New York (1985).
- [16] Langley J. N., Edkins J. S. : J.Physiol 7, 371-415 (1986).
- [17] Merino A. M., Vacquez J., Rodriguez J. C., Fernandez R., Quintela I., Gonzalez L.O., Sanchez L. M., Vizoso F.: Int. J. Biol. Markers 15, 165-170 (2000).
- [18] ten Kate R. W., Pals, G., Pronk J. C., Bank R. A., Eriksson A. W., Donker A. J.M.,Meuwissen S. G. M.: Clin. Sci. 75, 649-654 (1988).
- [19] Samloff I. M., Secrist D. M., Passaro E.: Gastroenterology 69, 1196-1200 (1975).
- [20] Samloff I. M., Varis K., Ihmaki T., Siurala M., Rotter J.I.: Gastroenterology 83, 204-209 (1982).
- [21] Samloff I. M.: v knize: Principles and practise of gastroenterology and hepatology (Gitnick G. ed.), Elsevier New York (1988).

- [22] Konishi N, Matsumoto K., Hiasa Y., Kitahori Y., Hayashi I., Matsuda H.: J. Clin.Pathol. 48, 364-367 (1995).
- [23] Huang S.C., Miki K., Sano J., Ichinose M., Kawamura N., Hirano K., Furihata C., Masugi Y., Takahashi K.: Jpn. J. Cancer. Res. (Gann) 79, 1139-1146 (1988).
- [24] Huang S.C., Miki K. Furihata Ch., Ichinose M., Schimizu A., Oka H.: Clin. Chim.Acta 175, 37-50 (1988).
- [25] Vizoso F., Sánchez L.M., Diez-Itza I., Merino A.M., López-Otin C.: J. Clin. Oncol. 13 (1995) 54-61.
- [26] Scorilas A., Diamandis E.P., Levesque M.A., Papanastasiou-Diamandi A., Khosravi M.J., Giai M., Ponzzone R., Roagna R., Sismondi P., López-Otin C.: Clin. Cancer.Res. 5 (1999) 1778-1785.
- [27] Díaz C.S., Vizoso F., Rodríguez J.C., Merino A.M., González L.O., Baltasar A., Pérez-Vázquez M.T., Medrano J.: World J. Surg. 23 (1999) 439-445.
- [28] Rojo J.V., Merino A.M., González L.O., Vizoso F.: Eur. J. Obstet. Gyn. R. B. 104 (2002) 58-63.
- [29] Konishi N., Nakaoka S., Matsumoto K., Nakamura M., Kuwashima S., Hiasa Y., Cho M., Uemura H., Hirao Y.: Pathol. Int. 49 (1999) 203-207.
- [30] Hassan M.I., Kumar V., Kashav T., Alam N., Singh T.P., Yadav S.: j. Sep. Sci. 30 (2007) 1979-1988.
- [31] Plebani M.: Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 30, 273-328 (1993).
- [32] Hallissey M.T., Dunn J.A., Fielding J.W.: Scand. J. Gastroenterol. 29, 1129-1134 (1994).
- [33] Webb P.M., Crabtree J.E., Forman D.: Gastroenterology 116, 269-276 (1999).
- [34] Šulc K., Vokurka M., v knize *Patologická fyziologie orgánových systémů, Část II* (Klener P. ed.), kap. 5., Karolinum Praha 2003.
- [35] Sun L.-P., Gong Y.-H., Wang L., Yuan Y.: World. J. Gastroenterol. 13 (2007) 6562-6567.
- [36] Kang J.M., Kim N., Yoo J.Y. Park Y.S., Lee D.H., Kim H.Y., Lee H.S., Choe G., Kim J.S., Jung H.C., Song I.S.: Helicobacter 13 (2008) 146-156.
- [37] Cao Q., Ran Z.H., Xiao S.D.: J. Dig. Dis. 8 (2007) 15-22.
- [38] Kawai T., Kawakami K., Kudo T., Takei K., Moriyasu F., Takagi Y., Aoki T.,

- Koyanagi Y., Serizawa H., Rinbara E., Noguchi M., Sasatsu M.: Digestive Endoscopy 16 (2004) 122-128.
- [39] Etherington D.J., Taylor W.H.: Biochem. J. 118 (1970) 587-594.
- [40] Foltmann B., Jensen A.L.: Eur. J. Biochem. 128 (1982) 63-70.
- [41] Hellman U.: *EXS* 88, 43 (2000)
- [42] Králová B., Rauch P.: v knize: Bioanalytické metody VŠCHT Praha (1995).
- [43] Samloff I. M.: Gastroenterology 82, 26-32 (1982).
- [44] Walker J. M., v knize: The Protein Protocols Handbook, Second Edition (Walker J. M., ed.), kap. 3. Humana Press, Totowa 2002.
- [45] Anson M. L., Mirsky A. E.: J. Genet. Physiol. 16 (1932) 59-63.
- [46] Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M., Yamamoto, T., 1993, Biosci. Biotech. Biochem., 57, 450-454.
- [47] Rose, M. E., Orlans, E., Buttress, N., 1974, Eur. J. Immunol, 4, 521-523.
- [48] Sunwoo, H. H., Nakano, T., Dixon, W. T., Sim, J.S., 1996, Poultry Sci., 75, 342-345.
- [49] Larsson, A., Carlander, D., Wilhelmsson, M., 1998, Food Agric. Immunol., 10, 29-36.
- [50] Juneja, L. R., Kim, M. v Hen Eggs: Their Basic and Applied Science (Yamamoto, T., Juneja, L. R., Hatta, H., Kim, M. eds), str. 57-72, CRC Press, USA, 1997
- [51] Polson, A., Wechmar, M. B. V., regenmortel, M. H. V. V., 1980, Immunol. Commun., 9, 475-493.
- [52] Bade, H., Stegemann, H., 1984, J. Immunol. Methods, 72, 421-426.
- [53] Hassl, A., Aspöck, H., 1988, J. Immunol. Methods, 110, 225-228.
- [54] Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T., 1990, Agric. Biol. Chem., 54, 2531-2535.
- [55] Akita, E. M., Nakai, S., 1993, J. Immunol. Methods, 160, 207-214.
- [56] Schwarzkopf, C., Thiele, B., 1996, ALTEX, 13 (Suppl. 96), 22-25.
- [57] Schwarzkopf, C., Thiele, B., 1996, ALTEX, 13 (Suppl. 96), 35-39.
- [58] Ntakarutimana, V., Demedts, P. Van Sande, M., Scharpé, S., 1992, J. Immunol. Methods, 153, 133-140.
- [59] Kuronen, I., Kokko, H., Mononen, I., Parviainen, M., 1997, Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 35, 435-440.

- [60] Larsson, A., Wejaker, P.-E., Forsberg, P.-O., 1999, *Food Agric. Immunol.*, 11, 43-49.
- [61] Leslie G. A., Clem L. W.: *J. Exp. Med.* 1969, 130, 1337
- [62] Jin L. Z., Baidoo S. K., Marquardt R. R., Frohlich A. A.: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1998, 21, 313.
- [63] Lee E. N., Sunwoo H. H., Menninen K., Sim J. S.: *Poultry Sci.* 2002, 81, 632.
. Chang H.-M., Lee Y.-C., Chen C. C., Tu Y.-Y.: *Food Chem. Toxicol.* 2001, 67, 15.
- [64] Hamada S., Horikoshi T., Minami T., Kawabata S., Hiraoka J., Fujiwara T., Ooshima T.: *Infect. Immunol.* 1991, 59, 4161.
- [65] Larsson A., Lindahl T.: *Hybridoma* 1993, 12, 143.
- [66] Larsson A and Sjöquist J 1988 Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in atex fixation tests; *J. Immunol. Methods*, 108, 205-208.
- [67] Carlander D, Stalberg J and Larsson A 1999 Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective; *Ups. J. Med. Sci.* 104, 179-189.
- [68] Benýšek J.: Příprava slepičích protilátek proti fosfoserinovým zbytkům fosfoproteinů, Diplomová práce, PřF UK, katedra biochemie, Praha (2012)
- [69] Emmerová T.: Nové typy magnetických sorbentů pro analýzu fosfoproteinů, Diplomová práce, PřF UK, katedra biochemie, (2011)

